蛋白质的结构与功能

阎隆飞编著



58.17421
798

蛋白质的结构与功能

阎隆飞 编著

中国科学院图书馆藏
中科院植物所图书馆
S0011910

湖南科学技术出版社

24831

前　言

分子生物学的主要内容是研究生物大分子的结构与功能的关系。因此，了解蛋白质的结构与功能是了解分子生物学的重要组成部分。但是，有关这方面的参考书比较少。R.E.Dickerson与I. Geis曾写过一本非常精彩的《蛋白质的结构与作用》(The Structure and Action of Proteins, Benjamin公司，1969年出版)，可惜十余年来此书尚无新版问世。

由于蛋白质三维结构的研究日益增多，决定蛋白质结构的新规律也随之不断出现。因此，深入了解蛋白质的结构必然会对进一步了解其功能作出贡献。近年来将定位诱变(site-directed mutagenesis)与DNA重组技术相结合研究蛋白质结构与功能的关系有了很大的突破，并且由此而产生了一门新的生物技术，即蛋白质工程(protein engineering)。可见蛋白质结构与功能的研究不仅具有重要的理论意义，而且还会在工业、农业、医药等应用上产生重大影响。本书正是为适应这方面的需要编写而成，供学习和研究生物化学的师生和科技人员参考。

本书蒙美国Duke大学J. S. Richardson教授惠赠她所设计绘制的一些蛋白质三维结构图片，这些精彩的图片对我们理解蛋白质的结构及其分类有很大帮助，编者致以深切的谢意。其余插图由北京农业大学余立彦同志绘制，在此一并致谢。

本书限于篇幅，未能将有关蛋白质结构与功能的问题一一加以讨论，遗漏之处很多，尚希读者予以指正。

编者

1987年8月

目　录

前言……………………………………………………………………（Ⅰ）
第一章　绪论………………………………………………………（1）
　一、蛋白质在生命活动中的重要性…………………………（1）
　二、蛋白质结构的一般概念…………………………………（3）
第二章　一级结构…………………………………………………（7）
　一、引言…………………………………………………………（7）
　二、氨基酸………………………………………………………（9）
　三、研究一级结构的方法……………………………………（13）
　四、研究蛋白质一级结构的意义……………………………（21）
　五、氨基酸的结构与蛋白质构象的关系……………………（24）
　六、蛋白质的顺序……………………………………………（27）
第三章　二级结构…………………………………………………（48）
　一、肽键………………………………………………………（48）
　二、Ramachandran 图 ………………………………………（50）
　三、螺旋………………………………………………………（56）
　四、β-折迭………………………………………………（58）
　五、回折………………………………………………………（61）
　六、β-突起………………………………………………（63）
　七、胶原螺旋…………………………………………………（63）
　八、纤维蛋白与二级结构……………………………………（65）

第四章　超二级结构……………………………………………………(69)
一、超二级结构的概念……………………………………………(69)
二、卷曲的卷曲α-螺旋……………………………………………(69)
三、βξβ 单元………………………………………………………(70)
四、β-迂回…………………………………………………………(73)
五、β-折迭桶………………………………………………………(74)
六、α-螺旋—转角-α-螺旋…………………………………………(78)
第五章　结构域……………………………………………………(80)
一、引言……………………………………………………………(80)
二、邻近相关性……………………………………………………(82)
三、结构域的一般性质……………………………………………(83)
四、一些蛋白质的结构域举例……………………………………(85)
五、结构域的运动…………………………………………………(86)
第六章　三级结构…………………………………………………(91)
一、蛋白质的折迭原则……………………………………………(91)
二、球蛋白的分类…………………………………………………(99)
三、膜蛋白的特殊结构……………………………………………(110)
第七章　四级结构…………………………………………………(122)
一、引言……………………………………………………………(122)
二、四级结构的对称性……………………………………………(123)
三、四级结构的接触表面…………………………………………(127)
四、寡聚蛋白的存在及其结构特点………………………………(129)
第八章　酶与催化作用……………………………………………(134)
一、引言……………………………………………………………(134)
二、酶·底物复合物………………………………………………(137)
三、酶的活性部位…………………………………………………(138)
四、对酶催化效率有贡献的因素…………………………………(142)

五、酶活性部位的反应机理……………………………………(152)
第九章　收缩蛋白与运动……………………………………(165)
一、引言……………………………………………………(165)
二、肌肉收缩与肌肉蛋白……………………………………(166)
三、肌球蛋白…………………………………………………(170)
四、肌动蛋白…………………………………………………(173)
五、非肌细胞的运动…………………………………………(176)
第十章　免疫球蛋白与防御作用…………………………(187)
一、引言……………………………………………………(187)
二、抗原……………………………………………………(188)
三、抗体……………………………………………………(193)
四、抗原抗体的相互作用……………………………………(206)
第十一章　血红蛋白与氧的运输…………………………(212)
一、引言……………………………………………………(212)
二、血红蛋白的结构…………………………………………(214)
三、血红蛋白与氧的运输……………………………………(217)
四、血红蛋白与 H^+ 及 CO_2 的运输……………………………(219)
五、血红蛋白的构象变化……………………………………(221)
六、异常血红蛋白…………………………………………(222)
第十二章　叶绿素蛋白与光能的转换……………………(227)
一、引言……………………………………………………(227)
二、叶绿素蛋白的分离和纯化………………………………(228)
三、叶绿素蛋白的结构………………………………………(230)
四、叶绿素蛋白的结构与吸收光能的关系…………………(234)
第十三章　糖蛋白与细胞识别……………………………(236)
一、引言……………………………………………………(236)
二、糖蛋白的结构…………………………………………(237)

三、糖蛋白与受精作用……………………………………………………(242)
四、根瘤菌与豆科植物的共生作用……………………………(245)
五、植物的抗病性与糖蛋白……………………………………(250)
第十四章　蛋白质的进化……………………………………………(252)
一、引言…………………………………………………………(252)
二、蛋白质一级结构的进化…………………………………(253)
三、蛋白质的三级结构与进化……………………………(262)

第一章 绪 论

一、蛋白质在生命活动中的重要性

生物体的重要组成物质是蛋白质和核酸。脱氧核糖核酸(DNA)是遗传信息的载体。但是遗传信息的复制、传递和表达则要依靠各种蛋白质才能完成。例如，在DNA链复制过程中，以各种核苷酸作为原料，还必须有各种酶及蛋白质才能将核苷酸按照DNA模板聚合成新的DNA分子。因此，核酸本身的合成也是依赖于蛋白质的一个复杂过程。又如核糖体（ribosome）是DNA翻译成蛋白质的核心，它是由蛋白质及RNA组成的微粒。近年来已经证明在核糖体内蛋白质合成的各个步骤（包括起始、转位、终止以及释放等）所需要的酶类都存在于其中，核糖体可以认为是一个翻译工厂。至于动植物各种生命活动中都可以看到蛋白质在起着重要作用。例如，细胞质中的细胞骨架（cytoskeleton）是由许多种蛋白质构成的三维网状结构，细胞的各种生命活动都是在细胞骨架上进行的。生命的运动依赖于各种运动蛋白。氧的运输要靠血红蛋白来完成。动物机体对疾病的抵抗力是由免疫球蛋白执行的。细胞能够识别“自己”与“非己”，是靠糖蛋白的特殊功能。机体的代谢活动要依赖各种酶和激素来完成，酶和激素也是蛋白质（有些激素是分子量

较小的肽）。可见蛋白质在生命活动中无所不在。最近发现的羊的瘙痒病（scrapie）的病因是一种最简单的具有感染性的蛋白因子（称为prion）引起，它是比类病毒还小的微生物，至今尚未检查出其中含有核酸物质，而只是一种蛋白质颗粒。虽然此问题还有待进一步研究，但却给我们提出了一个新的启示。

研究蛋白质的功能需要深入了解它们的结构，特别是空间结构（三维结构），因为结构决定功能。生命的功能和它的结构，二者是同一的。有什么样的结构必定有什么样的功能，反之亦然。例如，酶蛋白的催化功能只有在彻底弄清楚酶的活性中心与底物如何结合并且如何反应才算真正了解那种酶的作用机理，象溶菌酶就是这样。在蛋白质结构的研究中，Perutz对血红蛋白（Hemoglobin）的构象了解得最深入，并且弄清楚了血红蛋白与氧分子结合后构象的改变，从而阐述了机体中氧和二氧化碳的运载过程。肌肉及非肌细胞的收缩蛋白（contractile proteins）经过几十年的深入研究，已经对它们的结构有了详细的了解。因此，我们才能说明肌肉收缩与非肌细胞运动的机理。几十年来人们对免疫球蛋白（immunoglobulin）结构的大量研究工作，不但对免疫学的进展作出了重要贡献，而且在临床上也发挥了很大作用。即使在植物方面研究得较少，但是近年来对非肌细胞的收缩蛋白，光合细胞叶绿素蛋白的三维结构的研究也在推动着植物生物化学的发展。

因此，我们将在本书的前七章中详细介绍蛋白质结构原理的最新进展，并辅以最新的插图，以帮助读者理解蛋白质的构象；在后七章中我们将详细讨论几类重要蛋白质的结构与功能的关系以及蛋白质的进化，帮助读者理解生物界的奥秘。

二、蛋白质结构的一般概念

蛋白质结构的研究很早即已开始受到许多科学家的关注，并提出了多种假说，但是一直没有一个是令人满意的理论。直到 1952 年丹麦生物化学家 Linderstrom-Lang 第一次提出蛋白质结构的三级结构的概念，才使蛋白质结构的研究走上了正确的道路。Linderstrom-Lang 的三级结构概念是：一级结构 (primary structure) 是指多肽链中氨基酸的顺序(sequence)。靠共价键维持多肽链的连接，而不涉及其空间排列；二级结构 (secondary structure) 是指多肽链骨架 (backbone) 的局部空间结构，不考虑侧链的构象 (conformation) 及整个肽链的空间排列；三级结构 (tertiary structure) 则是指整个肽链的折迭情况，包括侧链的排列，也就是蛋白质分子的空间结构或三维结构 (three dimensional structure)。自从这一概念提出以来，立即得到科学家的接受。1958年，英国晶体学家 Bernal 在研究蛋白质晶体结构时发现，并非所有蛋白质的结构都达到三级结构水平，而有些蛋白质则有更复杂的结构，即由几个构成蛋白质的亚基 (subunit) 结合成几何状排列，许多蛋白质是由相同的或不同的亚基组成，并靠非共价键结合在一起，他将这种结构称为四级结构 (quaternary structure)。现在蛋白质的一、二、三、四级结构的概念已由国际生化协会 (IUB) 的生化命名委员会采纳并作出正式定义。目前蛋白质的一级结构已由Sanger提出的第一个胰岛素 (insulin) 顺序发展到1700多种蛋白质，三级结构也由 Kendrew 及 Perutz 提出的肌红蛋白 (myoglobin) 及血红蛋白 (hemoglobin) 的开创性研究迅速发展起来。现在已经有200多种蛋白质 (包括酶)的三维结构利用

X-射线衍射技术在不同分辨率水平上得到了阐明，大大丰富了我们对蛋白质结构的认识。

由于目前已有200 多种蛋白质三维结构（3-D structure）的研究资料，大大丰富了我们对蛋白质空间结构规律的认识，因此，蛋白质四级结构水平的概念已不能满足我们的要求。因此近年来蛋白质化学家又在四级结构水平的基础上增加了两种新的水平，即超二级结构(supersecondary structure)和结构域(structural domain)。超二级结构是1973年 Rossman 提出的，是指几种二级结构的组合物存在于各种结构中。结构域的概念是由免疫化学家Porter 提出的，是指蛋白质分子中那些明显分开的球状部分。如动物的免疫球蛋白（Ig G)含有12个结构域。现在已有很多种蛋白质被证明含有明显的结构域。这两种新的概念目前已被生物化学家及分子生物学家所公认。现在我们用图1·1及图1·2表示蛋白质结构的六种水平，以有助于大家的理解。

由于蛋白质晶体学的发展，今后将有越来越多的蛋白质的三维结构被阐明，并且将会从中找出更多的结构规律，从而深入了解蛋白质结构与功能之间的关系，从分子水平上解释生命

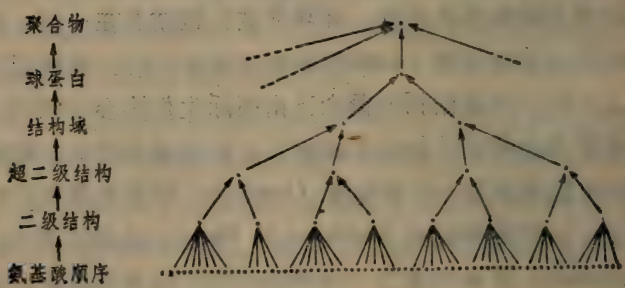


图1·1　球状蛋白结构的不同水平

现象，有助于人们对生命奥秘取得更深入的理解。同时这不仅仅是个理论问题，根据蛋白质结构的研究，现在已经产生了蛋白质工程 (protein engineering)的新技术，利用现代生物技术改造蛋白质分子结构，使之更符合人类的需要，如提高酶的活

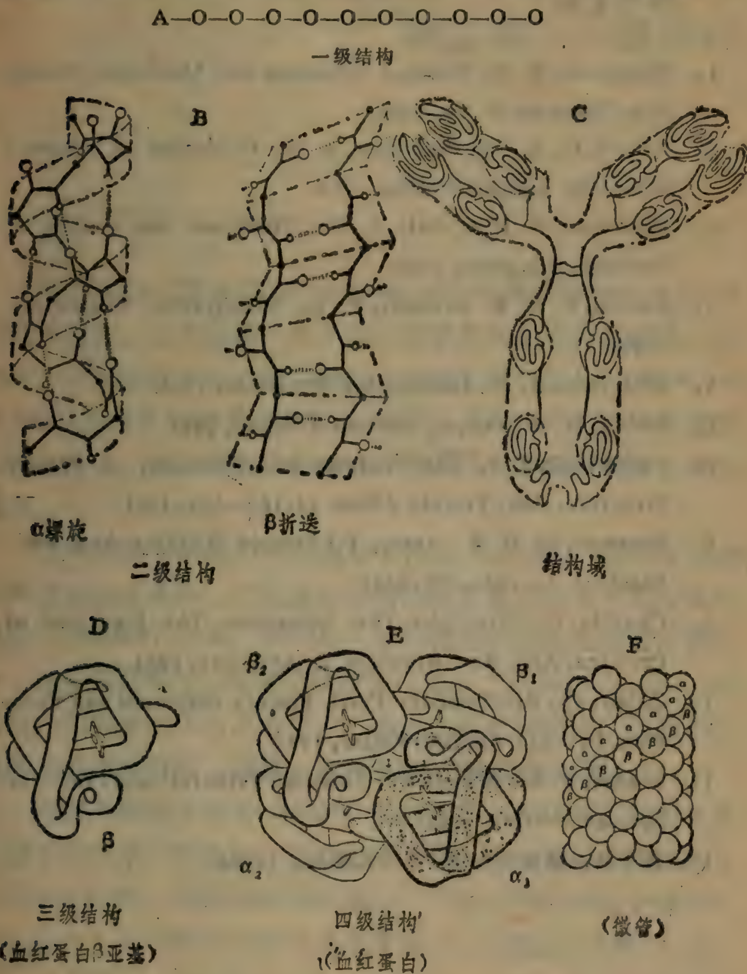


图1.2 蛋白质各级结构的示意图

性等。使蛋白质生物化学的理论知识应用于生产实际，将对人类作出更大的贡献。

参考文献

1. Creighton, T. E.: Proteins Structure and Molecular Principles, Freeman & Co, 1983.
2. Schulz, G. E. & Schirmer, R. H.: Principles of Protein Structure, Spinger-Verlag, 1979.
3. Dickerson, R. E & Geis, I.: The Structure and Action of Proteins, Benjamin, 1969.
4. Canton, C. R. & Schimei, P. R.: Biophysical Chemistry, 1980.
5. Dickerson, R. E.: Hemoglobin Benjamin, 1983.
6. Ghelis, G. & Yon, J.: Protein Folding, 1982.
7. Richardson, J. S.: The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, Adv. Protein Chem. 34:167—339, 1981.
8. Rossman, M. G. & Argos, P.: Protein Folding Ann. Rev. Biochem. 50:497—532, 1981.
9. Chothia, C.: Principles That Determine The Structure of Proteins, Ann. Rev. Biochem. 53:537—572, 1984.
10. Zubay, G.: Biochemistry Partl. Protein Structure and Function, P_1—240 AddisonWesley, 1983.
11. Scopes, R. K.: Protein Purification: Principle and Practice, Springer-Verlag, 1982.
12. 鲁子贤，蛋白质化学，科学出版社，1982。

第二章　一级结构

一、引言

蛋白质的一级结构(primary srtucture)是Linderstron-Lang首先提出的。在此以前，关于蛋白质结构的理论异常混乱，出现过不少错误的概念，如二酮二氮六环学说。自从Linderstron-Lang提出蛋白质结构三种层次的概念及Bernal关于四级结构的补充之后，蛋白质化学的研究才走上了科学的和迅速发展的道路。

蛋白质是不分枝的生物高分子(biopolymer)。蛋白质是由20种氨基酸组成的，而组成多肽链的氨基酸残基有一定的排列顺序(sequence)。因此，蛋白质一级结构的概念就是指蛋白质分子中氨基酸的顺序，通常一级结构还包括二硫键(—S—S—)的定位，因为有些蛋白质分子由二条以上的肽链组成，链间半胱氨酸残基常结合成二硫键，即胱氨酸，如溶菌酶(图2·1)。

英国生物化学家 F. Sanger 经过近10年的研究，利用氨基末端分析技术、纸电泳、纸层析等方法，于1953年首次将胰岛素(insulin)的一级结构的奥秘揭开，开创了蛋白质化学的新纪元。此后，由于更多的蛋白质化学技术，如羧基末端分析、Edman 降解等，特别是 Moore 与 Stein 的氨基酸自动分析仪

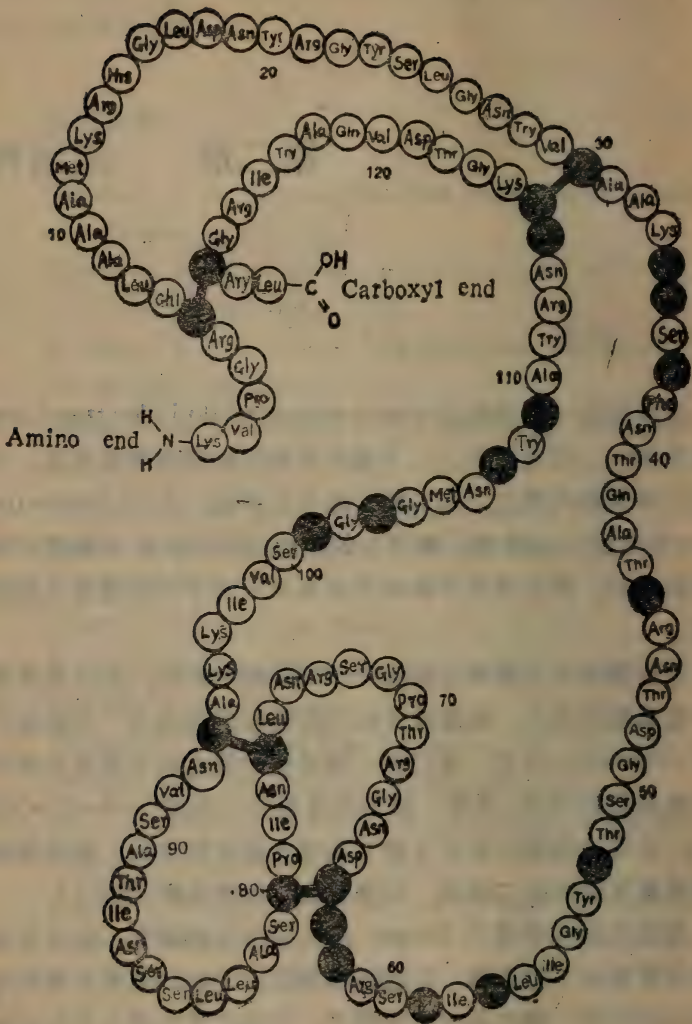


图2·1　溶菌酶(Lysozyme)的氨基酸顺序
(图中黑点代表半胱氨酸)

(amino acid analyser)和Edman的蛋白质顺序仪(Protein sequencer)的发明，蛋白质顺序的研究有如雨后春笋，愈来愈多的蛋白质的一级结构已经被彻底阐明。目前国际生物化学各种期刊几乎每期都有新的蛋白质的一级结构的报道。

近年来由于核酸一级结构研究技术的发展异常迅速，特别是DNA顺序的测定，利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis)可以很容易地测定出脱氧核糖核苷酸的顺序。因此，测定出DNA顺序后，就可以利用遗传密码字典将碱基编码的氨基酸残基确定，从而可以获得蛋白质的一级结构。这项研究工作现在已有不少报告，并且证明由DNA顺序判断的氨基酸顺序与由蛋白质测定的结果是完全一致的。当然对真核细胞来说，则要排除其中插入的顺序(intervening sequence)或内含子(intron)，才能获得蛋白质一级结构的真正顺序。

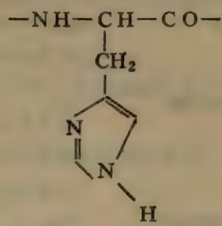
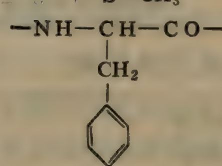
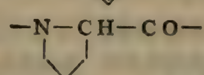
二、氨基酸

蛋白质是由20种氨基酸组成的，所有这些氨基酸(甘氨酸除外)都属于L-构型(L-configuration)，它们是在生物合成时在核糖体上一个一个装配上去的。不过，有不少氨基酸残基在翻译后可以进行化学修饰，如甲基化、磷酸化、糖基化、羟基化、氧化或与辅基连结。20种蛋白质氨基酸残基的结构，残基重量以及它们的缩写列于表2·1中。一些较为常见的修饰过的残基的结构及其在蛋白质中存在的例子则列于表2·2中。

表2·1　　20种蛋白质中的氨基酸

氨基酸	三个字母缩写	单个字母缩写	在蛋白质中氨基酸的结构	残基重量（道尔顿）
丙氨酸Alanine	Ala	A	—NH—CH—CO— CH_3	71.1
精氨酸 Arginine	Arg	R	—NH—CH—CO— $(CH_2)_3$ NH C=NH NH_2	156.2
天冬酰胺Asparagine	Asn	N	—NH—CH—CO— CH_2 $CONH_2$	114.1
天冬氨酸Aspartic acid）	Asp	D	—NH—CH—CO— CH_2 COOH	115.1
（天冬酰胺或Aspargine or 天冬氨酸aspartic acid）	Asx	B		
半胱氨酸Cysteine	Cys	C	—NH—CH—CO— CH_2SH	103.1
谷氨酸Glutamic acid	Glu	G	—NH—CH—CO— CH_2 CH_2COOH	129.1
谷氨酰胺Glutamine	Gln	Q	—NH—CH—CO— CH_2 CH_2CONH_2	128.1
（谷氨酸或Glutamic acid 谷氨酰胺or Glutamine）	Glx	Z		
甘氨酸 Glycine	Gly	G	—NH—CH_2—CO—	57.1

续表1

氨基酸	三个字母缩写	单个字母缩写	在蛋白质中氨基酸的结构	残基重量（道尔顿）
组氨酸 Histidine	His	H		137.2
异亮氨酸 Isoleusine	Ile	I	—NH—CH—CO— CH—CH_3 CH_2CH_3	113.2
亮氨酸 Leusine	Leu	L	—NH—CH—CO— CH_2 CH—CH_3 CH_3	113.2
赖氨酸 Lysine	Lys	K	—NH—CH—CO— $(CH_2)_4$ NH_2	128.2
甲硫氨酸 Methionine	Met	M	—NH—CH—CO— CH_2 CH_2 S—CH_3	131.2
苯丙氨酸 Phenylalanine	Phe	F		147.2
脯氨酸 Proline	Pro	P		97.1

续表2

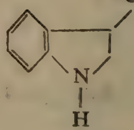
氨基酸	三个字母缩写	单个字母缩写	在蛋白质中氨基酸的结构	残基重量（道尔顿）
丝氨酸 Serine	Ser	S	—NH—CH—CO— │ CH_2OH	87.1
苏氨酸 Threonine	Thr	T	—NH—CH—CO— │ CHOH │ CH_3	101.1
色氨酸 Tryptophan	Trp	W	—NH—CH—CO— │ CH_2 	186.2
酪氨酸 Tyrosine	Tyr	Y	—NH—CH—CO— │ CH_2  OH	163.2
缬氨酸 Valine	Val	V	—NH—CH—CO— │ CH—CH_3 │ CH_3	99.1

表2·2　蛋白质中天然存在化学修饰的残基的一些例子

氨基酸	蛋白质举例*
N-三甲基丙氨酸	E.coli 核糖体蛋白 L11
N^{ω}-甲基精氨酸	组蛋白
N^{ω}-(ADP-核糖)精氨酸	E.coli 依赖 DNA 的RNA聚合酶
N^{4}-(N-乙酰氨基葡萄糖)-天冬酰氨	多种糖蛋白，卵清蛋白

续表

氨基酸	蛋白质举例
胱氨酸	多种蛋白质
S-半胱氨酰—血红素	细胞色素C
S-(二酰基甘油)半胱氨酸	E.coli 外膜胞壁质脂蛋白
γ-羧基谷氨酸	血凝蛋白
o-(ADP-粒糖)谷氨酸	鼠肝富赖氨酸的组蛋白
τ-甲基组氨酸	肌动蛋白
N^6-甲基赖氨酸 N^6-二甲基赖氨酸 N^6-三甲基赖氨酸	核糖体蛋白及组蛋白
N^6-(γ-谷氨酰)赖氨酸	丝蛋白、羊毛蛋白
N^ϵ-生物素赖氨酸	羧化酶
赖氨酸正亮氨酸	胶原及弹性蛋白酶
锁链赖氨酸，Pydinoline	
5-羟基赖氨酸，4-羟基脯氨酸	
O^3-半乳糖胺基丝氨酸	糖蛋白
O^3-磷酸丝氨酸	磷蛋白（包括酪蛋白、糖原磷酸化酶及组蛋白）
O^3-磷酸苏氨酸	

三、研究一级结构的方法

目前测定蛋白质氨基酸顺序(amino acid sequence)的程序是根据 Moore 与 Stein的基本战略。它先将多肽链降解成足够短的顺序以便得到整个顺序。蛋白质顺序测定包括以下步骤：(1) 蛋白质的纯化；(2) 测定氨基末端及羧基末端的氨基酸；(3) 至少以两种方式将多肽专一地断裂成小的片段；(4) 分离并测定用不同断裂方式获得的小肽的顺序；(5) 根据小肽顺序

的重迭重组这些小肽以确定整个顺序。

下面是测定蛋白质顺序的战略：

(1) 蛋白质的纯化(均一)

(a)凝胶电泳

(b)氨基酸分析

(2) 测定

(a)自动顺序仪测定N末端可达到70个残基

(b)裂解

(i)酶法：如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、嗜热菌蛋白酶等

(ii)化学法：如溴化氰(CNBr)法

(3) 裂解后肽段的纯化

(a)高效液相色谱(HPLC)

(b)纸电泳

(i)用不同pH

(ii)下行层析

(4) 氨基酸分析以确定肽段性质

(a)纯度

(b)组成

(c)含量

(5) 顺序测定

(a)自动顺序仪测定：可达20个残基

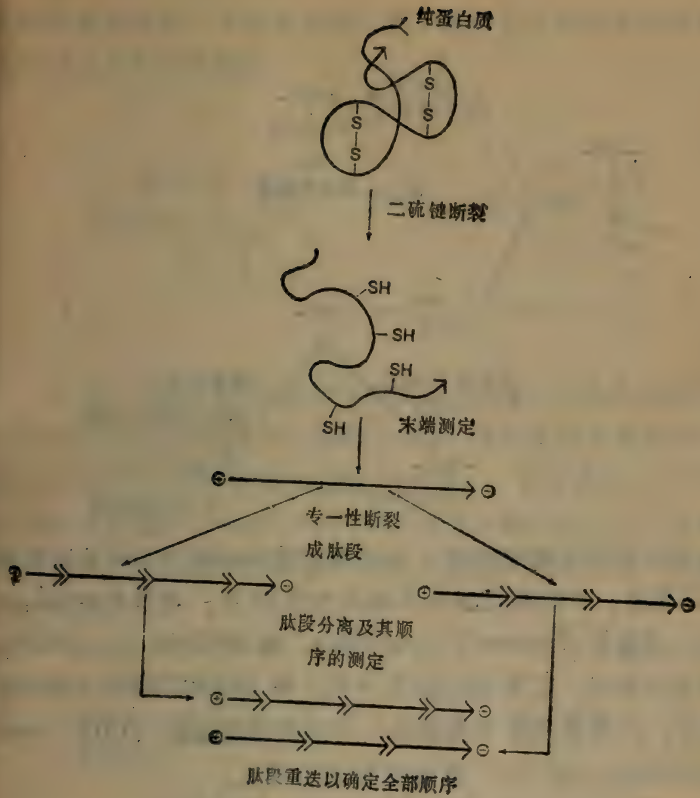
(b)手工顺序测定

(i)Dansyl氯法

(ii)Edman降解法

(c)确定氨基酸顺序

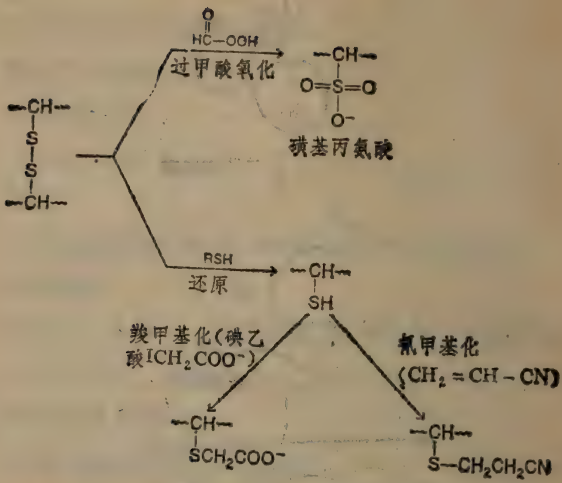
(6) 将各个不同肽段排列，根据多肽段的肽段的重迭情况以确定整个顺序



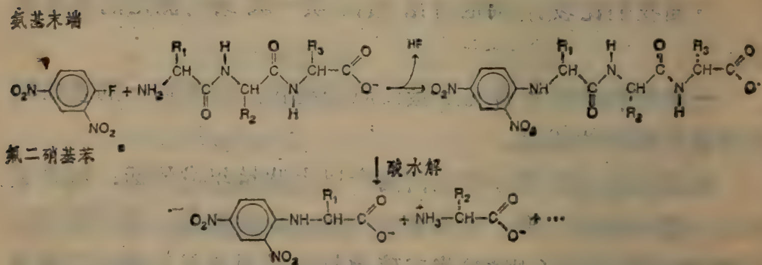
下面我们比较详细地讨论蛋白质一级结构测定的具体步骤。

一级结构的测定首先是蛋白质的纯化，只有均一的蛋白质才能进行顺序的测定。

如果某些蛋白质分子是由两个以上肽链组成的话，测定它们的一级结构时，第一步须将其中的二硫键断裂，通常是用过甲酸（即过氧化氢＋甲酸）将二硫键氧化或用巯基乙醇将二硫键还原，如下式：

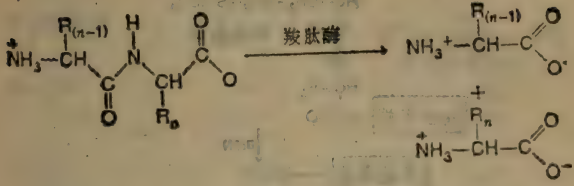


蛋白质顺序测定的第二步是测定肽链的氨基(N)末端和羧基(C)末端。目前测定氨基末端的方法很多。最早是用Sanger的氟二硝基苯(Fluorodinitrobenzene，简称FDNB)法，用FDNB处理蛋白质后，随之用6N盐酸水解，释放出FDNB标记的N端氨基酸，此氨基酸带有黄颜色，可以用薄层层析（Thin layer chromatography,TLC)或纸电泳进行鉴定。

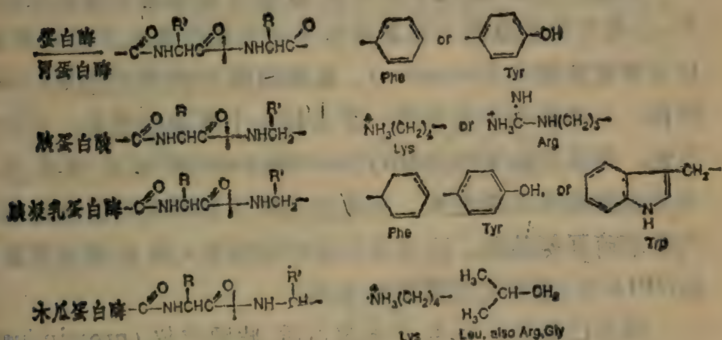


羧基末端的测定通常采用羧肽酶(Carboxypeptidase)法。

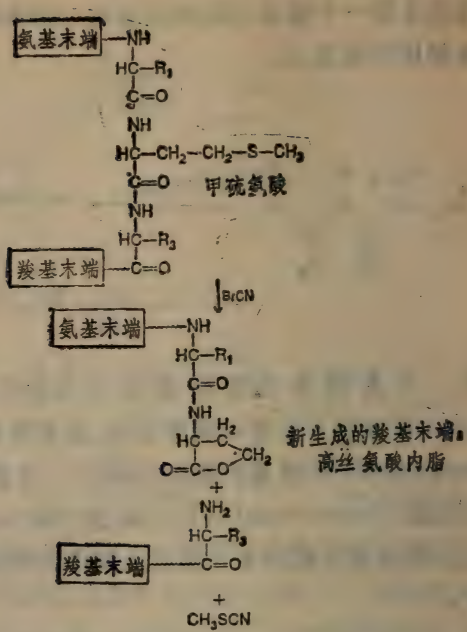
羧肽酶每次水解一个羧基末端的氨基酸。而末端氨基酸的种类则可用各种层析法鉴定。



再下一步是将多肽链断裂成几个短的肽段(peptide fragmentso),以便进一步进行顺序分析。通常我们采用肽链内切酶(endopeptidase)如胰蛋白酶(trypsin)、胃蛋白酶(papsin)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)及木瓜蛋白酶(papain),这些酶的特征是分别在蛋白质的专一部位上催化肽链的裂解,其裂解部位如下:

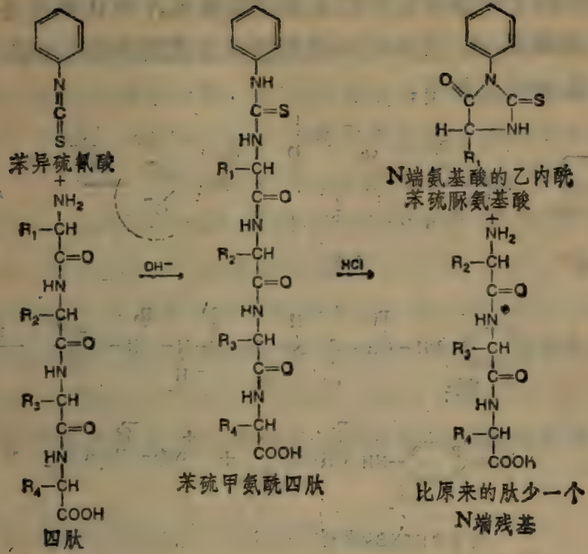


此外,还有一个化学法可以断裂多肽链,这就是溴化氰法(Cyanogen bromide)。这个反应能够专一地断裂甲硫氨酸,使甲硫氨酸变成高丝氨酸内酯(homoserine lactonc):

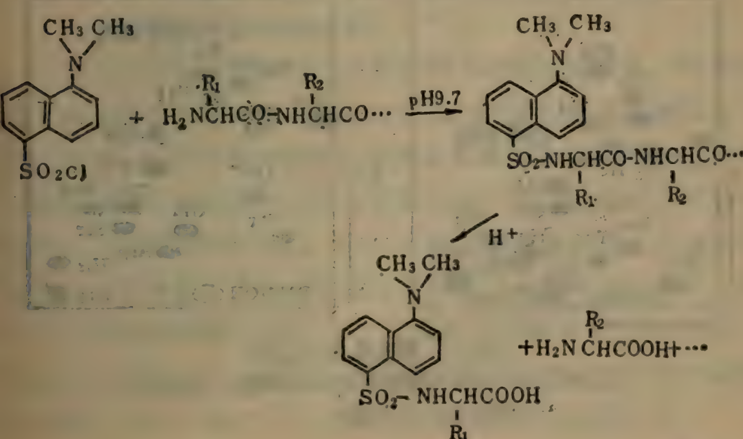


由蛋白质断裂得到的肽段通常可以用离子交换层析法分开，分离开的肽段既可以氨基酸自动分析仪测定其氨基酸组分，也可测定其顺序（sequence）。氨基酸顺序的测定是用Edman降解法，从多肽的氨基末端一步去掉一个氨基酸残基，然后进行鉴定，用苯异硫氰酯（phenylisothiocyanate）与末端氨基酸结合形成肽基苯甲氨酰肽，用盐酸温和水解释放出氨基末端的乙内酰苯硫脲氨基酸。这可以用各种层析法（最好用高效液相层析HPLC法）鉴定它是哪种氨基酸。

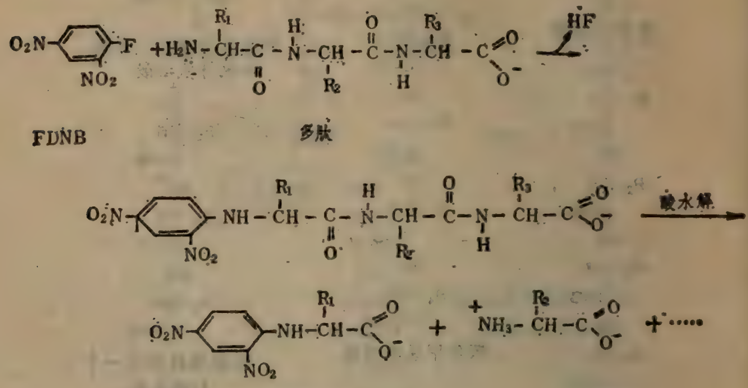
现在已经设计并生产出蛋白质/肽顺序仪（protein/peptide sequencer），使Edman降解步骤可以自动化，大大加速了蛋白质顺序的研究。例如，美国Beckman仪器公司的新产品890系列蛋白质顺序仪，每昼夜可以测定36个氨基酸残基。



丹磺酰氯法（Dansyl chloride method）：Hastley 于1970年研究胰凝乳蛋白酶时发现丹磺酰氯（5-二甲氨基萘-7-磺酰氯）可以作为一个标记试剂，它能与蛋白质的氨基专一地反应，



所形成的衍生物在以后用酸水解时很稳定，他认为这是一个适当的N-末端试剂，比Sanger试剂的灵敏度至少高100倍，这个试剂与多肽的反应如下：



有色的FDNB氨基酸

最初用高压电泳法分离水解后形成的DNS氨基酸，而后来改用聚酰胺(polyamide)薄层层析，效果大为改善，用双向聚酰胺薄层层析可以得到非常好的结果(图2·2)。

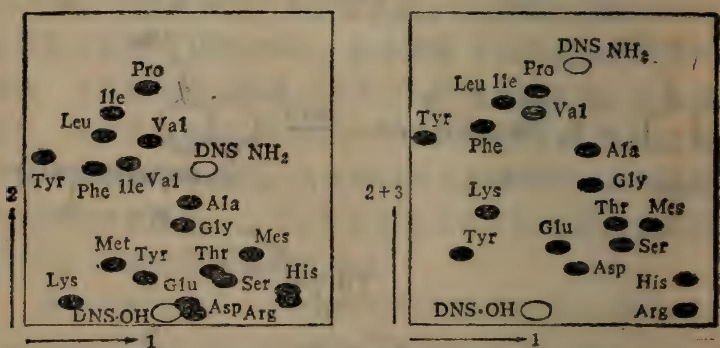


图2·2 聚酰胺薄层层析
(DNS NH_2为待测定的N末端氨基酸，已经丹磺酰化，发荧光)

一旦获得各别肽段的顺序之后，下一步还要了解它们在完整蛋白质中是如何连接在一起的。这需要用两种不同的断裂多肽链的方法进行顺序分析。因为两组顺序测定的结果有重迭顺序(overlapping sequences)，这就可用以确定蛋白质的整个顺序。

空棘鱼 (ooelacanth) 肌肉中的磷酸丙糖异构酶 (triose phosphate isomerase) 的氨基酸顺序，就是 Kolb，Harris及Bridgen(1974)用上述方法测定出来的。这个蛋白质共含248个氨基酸残基。他们采用 CNBr 法或胰蛋白酶法将这个蛋白质分别裂解为3个肽段(CNBrI—CNBrIII)或4个肽段(T_1—T_4)，然后再用Edman降解法及羧肽酶法鉴定出各肽段的氨基酸顺序。

四、研究蛋白质一级结构的意义

研究蛋白质一级结构对我们了解蛋白质结构与功能的关系、生物进化以及蛋白质结构的预测等重要生物学问题都具有重要意义，下面我们加以简单的讨论。

1.一级结构与功能的关系

蛋白质中氨基酸顺序与生物功能具有密切的关系，特别是蛋白质与其他生物大分子的相互作用都是由氨基酸顺序决定的。例如，红细胞膜的膜蛋白中的血型糖蛋白(glycophorin)的一级结构就与生物膜的结构有重要关系。血型糖蛋白分子量为31000，含糖量约为60%，由131个氨基酸残基组成。它的分子含有16条寡糖链，其中唾液酸含量很高。血型糖蛋白分子一部分位于细胞的外面（图2·3)，为氨基末端部分，含有糖残基，是亲水的肽段；中间的部分位于细胞膜的中央，由疏水的氨基酸组成；还有一部分位于细胞的内部，也是亲水的肽段。

由于这三部分氨基酸残基顺序不同，分别与它们的功能有关。如细胞外的部分含有寡糖链，与细胞识别（cellular recognition）有关。血型糖蛋白的中央部分由于由疏水残基组成，故与生物膜的膜脂(membrane lipid)紧密结合在一起。细胞内的部分由于是亲水的，故能溶于细胞质之中。

蛋白质与核酸的结合也与蛋白质顺序有密切关系。例如，在真核生物的染色体中DNA是与组蛋白(histone)结合的，其结合的部位依靠蛋白质中氨基酸残基所带的电荷。小牛组蛋白含有129个氨基酸残基，在前36个氨基酸中有12个带有正电荷(如Lys，Arg等)，而不带负电荷。因此，这部分肽段能与DNA双螺旋中带负电荷的磷酸基团相结合，而其余部分则折迭成球状(图2·4)。

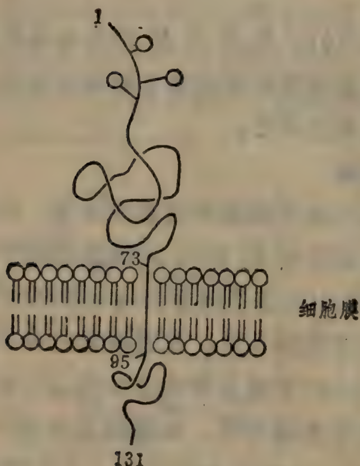


图2·3 血型糖蛋白(Glycophorin)在生物膜上的结构

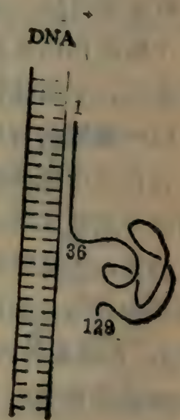


图2·4 小牛的组蛋白IIa

如果蛋白质的一级结构发生变化，往往导致功能的改变。例如，正常人血红蛋白(hemoglobin)β 链的N端部分顺序如下：

HbA　Val · His · Leu · Thr · Pro · *Glu* · Glu · Lys……

HbS　Val · His · Leu · Thr · Pro · *Val* · Glu · Lys……

但是，患镰刀形贫血病(sickle cell anemea)病人的血红蛋白(HbS) 的顺序发生了改变，第 6 位的谷氨酸变成了缬氨酸，Pauling将这种现象称为分子病(molecular disease)。这个问题以后在第十一章中我们还要详细讨论。

2.蛋白质的一级结构与生物进化

从蛋白质一级结构的比较研究充分证实了达尔文 (C·Darwin)进化论的正确。例如，从低等生物到高等生物中细胞色素C一级结构的比较，从脊椎动物血红蛋白一级结构的比较，所绘制出的进化树(evolutionary tree)与分类学研究的结果完全一致。由此可以看出，生物的进化过程与蛋白质顺序的变化存在密切关系，这个问题我们将在第十四章详细讨论。

3.从蛋白质的一级结构预测其二、三级结构

研究蛋白质一级结构的一个重要目的是利用氨基酸顺序的资料预测(prediction)蛋白质的二级结构以至三级结构，甚至还可以预测蛋白质的某些功能，因为蛋白质的一级结构包含着蛋白质分子的所有的结构信息(structure informations)，我们可以利用这些信息预测出蛋白质的空间结构。Levitt 及 Warshel (1975)从胰蛋白酶抑制剂的氨基酸顺序之间的热力学相互作用的数据(最小能量energy minimisation及热能化thermalisation)模拟了蛋白质的折迭，其结果与用x-射线衍射的结果有相当好的一致性。此外，Chou及Fasman(1979)根据蛋白质中氨基酸残基形成α-螺旋、β-折迭片或β转角的倾向，预测由一级结构折迭成二级结构，超二级结构的构象也得到了很好的结果。现在，已

开始利用微电脑研究蛋白质的分子图象(molecular graphics)。英国成立了生物化学微电脑组织(Biochemistry Microcomputer Group)，我们相信，随着电子计算机在生物学中的广泛应用，今后这方面的进展将会加速。Sauer等(1982)曾经指出，"顺序的同源性反映出结构的同源性"，这是很有指导意义的概念。

五、氨基酸的结构与蛋白质构象的关系

蛋白质的一级结构决定蛋白质的高级结构（三维结构，3-Dimensional structure)。虽然蛋白质的基本骨架是由肽键连接的肽链，但肽链上的侧链(side chains)则是形形色色的，不同的侧链具有不同的性质，它们对蛋白质构象的贡献不一样。因此可以说，蛋白质的信息就存在于这些侧链之中。多肽链的侧链R 的顺序决定着蛋白质的三维结构及蛋白质的性质包括它们的生物功能。为了更好地理解蛋白质的结构，我们必须熟悉氨基酸侧链的结构和性质，下面我们分别加以讨论。

1.甘氨酸

甘氨酸(Glycine)不含侧链，α-C原子上有二个氢原子，它是唯一不含不对称α-C 原子的氨基酸。由于没有侧链的干扰，它增加了主链的灵活性(flexibility)。另外，由于它的侧链小(仅一个氢原子)，当蛋白质的主链需要彼此靠近时，就需要甘氨酸残基。由于这些原因使得Gly在蛋白质的进化过程中成为一个保守的氨基酸。

2.丙氨酸

丙氨酸(Alanine)的侧链为一个甲基(CH_3^-)，丙氨酸是最丰富的一种氨基酸，这可能是由于它的结构简单并且易于获得，只有甘氨酸比它更容易制造。

3.分枝的侧链

缬氨酸(Valine)，亮氨酸(Leucine)，异亮氨酸(Isoleucine)的侧链是非极性的，并且是分枝的。分枝使得侧链内部的灵活性受到很大限制，这些分枝使得侧链变硬，而硬的侧链使它们容易固定在某一位置上。由于它们的侧链的非极性性质，很容易与疏水部位（如生物膜）结合。

4.芳香族氨基酸分子在C_α原子与芳香环之间有亚甲基$-CH_2-$作为间隔

在苯丙氨酸(phenylalanine)及色氨酸(tryptophane)中，在C_α原子及芳香环之间存在一个C_β亚甲基，这个亚甲基上的侧链有一定的灵活性。如果没有亚甲基的存在，则主链会变得太硬。脯氨酸(proline)也是非极性的，它的侧链转回来与主链连接，因此其侧链是刚性的。脯氨酸对肽链形成螺旋有破坏性，但对形成β转角有帮助（见第三章）。

上述所有非极性残基，包括 Val、ILe、Leu、Phe、Pro、Trp都位于蛋白质分子的内部。

5.极性侧链可形成氢键(hydrogen bonds)

具有极性及中性的侧链的残基为半胱氨酸(Cysteine)、丝氨酸(Serine)、苏氨酸(Threonine)、天冬酰胺(Asparagine)、谷酰胺(Glutamine)及酪氨酸(Tyrosine)。半胱氨酸能与主链上其它Cys残基形成-S-S-键(即胱氨酸Cystine)。

丝氨酸及苏氨酸具有羟基，能形成氢键，苏氨酸多一个C_β原子。天冬酰胺及谷酰胺的酰胺基也能形成氢键，氨基为氢的供体，羰基为氢的受体，Gln比Asn多含一个亚甲基，使得其极性基团更灵活些，并降低它们与主链的相互作用。

酪氨酸的pH值为10.1，其极性的羟基在高pH值时解离，故Tyr 的行为很象带电荷的侧链，所形成的氢键亦较强。中性的

极性残基一般都存在于蛋白质分子的表面，不过也有些存在于分子内部，作为蛋白质分子内部残基，它们通常彼此形成氢键，或与多肽链形成氢键(表2·2)。

表2·2　　蛋白质分子中存在的氢键

氢　键　类　型	供体与受体间的距离（Å）	从范德华半径计算供体受体间距离的降低(%)
羟基-羟基 —O—H···OH⁻	2.8±0.1	25
羟基-羰基 —O—H···O=C<	2.8±0.1	25
酰胺基-羰基 >N—H···O=C<	2.9±0.1	20
酰胺基-羟基 >N—H···OH⁻	2.9±0.1	20
酰胺基-咪唑基 >N—H···N<	3.1±0.2	15
酰胺基-硫基 >N—H···S<	3.7	10

6.组氨酸适于催化作用

组氨酸(Histidine)含有芳香的杂环侧链(咪唑)，其pH值为6.0，这个pH值是在生物的生理范围内，其咪唑环既可脱去电荷，也可以从溶液中获得H^+离子，带上电荷。由于这两种状态很容易得到，因此His非常适于催化化学反应。我们知道，组氨酸残基存在于大多数酶的活性中心(active center)中，就是由于这个道理。

7.带电荷的侧链通常位于分子表面

天冬氨酸(Aspartic acid)和谷氨酸(Glutamic acid)都带有负电荷。天冬氨酸的羧基侧链比谷氨酸要短些，对主链来说天冬氨酸的刚性更强些。在酶的活性中心羧基由Asp优先供应，而不是由Glu供应，其原因可能就在于此。通常这两类残基都位于蛋白质分子的表面。

赖氨酸(Lysine)和精氨酸(Arginine)则带有正电荷。它们通常也位于蛋白质分子表面。它们的侧链长，比较灵活，可以增加蛋白质的溶解度。有时候 Lys 及 Arg 参与分子内部盐桥(salt bridge)的形成：

$$—COO^{\ominus}\cdots H_3N^{\oplus}—。$$

由于它们暴露于蛋白质分子表面，赖氨酸与精氨酸更容易受到酶（特别是蛋白酶)的攻击，成为酶的靶子(target of enzyme)。例如，胰蛋白酶就容易在赖氨酸或精氨酸的羧基末端将多肽链切断。

8.疏水性(hydrophobicity)决定于表面积

多肽链的折迭过程决定于氨基酸残基侧链的疏水性（非极性)，因为在球蛋白中必须形成一个疏水的核心（hydrophobic core)，它是肽链折迭的一个重要动力。

六、蛋白质的顺序

自从 Sanger（1955）测定了胰岛素（insulin）的顺序(sequence）以来，由于测定方法的不断改进和各国化学家及生物化学家的努力，目前已有1700余种蛋白质的顺序被测定出来。近10年来，每年大约可以测定出100多种新的蛋白质顺序，这对生物化学的发展无疑是至关重要的。我们在下面列举一批较常见的蛋白质顺序，供读者参考。读者如果要详细了解其它蛋白质的一级结构，可以查阅文献2，会得到更多的蛋白质顺序。(顺序下面的资料为文献来源)

(1) 肌红蛋白 (Myoglobin) 〔抹香鲸〕

	1				5					10					15	
1	VAL	LEU	SER	GLU	GLY	GLU	TRP	GLN	LEU	VAL	LEU	HIS	VAL	TRP	ALA	15
16	LYS	VAL	GLU	ALA	ASP	VAL	ALA	GLY	HIS	GLY	GLN	ASP	ILE	LEU	ILE	30
31	ARG	LEU	PHE	LYS	SER	HIS	PRO	GLU	THR	LEU	GLU	LYS	PHE	ASP	ARG	45
46	PHE	LYS	HIS	LEU	LYS	THR	GLU	ALA	GLU	MET	LYS	ALA	SER	GLU	ASP	60
61	LEU	LYS	LYS	HIS	GLY	VAL	THR	VAL	LEU	THR	ALA	LEU	GLY	ALA	ILE	75
76	LEU	LYS	LYS	LYS	GLY	HIS	HIS	GLU	ALA	GLU	LEU	LYS	PRO	LEU	ALA	90
91	GLN	SER	HIS	ALA	THR	LYS	HIS	LYS	ILE	PRO	ILE	LYS	TYR	LEU	GLU	105
106	PHE	ILE	SER	GLU	ALA	ILE	ILE	HIS	VAL	LEU	HIS	SER	ARG	HIS	PRO	120
121	GLY	ASP	PHE	GLY	ALA	ASP	ALA	GLN	GLY	ALA	MET	ASN	LYS	ALA	LEU	135
136	GLU	LEU	PHE	ARG	LYS	ASP	ILE	ALA	ALA	LYS	TYR	LYS	GLU	LEU	GLY	150
151	TYR	GLN	GLY													165

Amino Acid Sequence of Sperm Whale Myoglobin.

A. B. Edmundson.

Nature, **205**, 883—887 (1965).

And

Residue 122 of Sperm Whale and Horse Myoglobin.

A. E. R. Herrera and H. Lehmann.

Biochim. Biophys. Acta, **336**, 318—323(1974).

(2) 核糖核酸酶 (Ribonuclease) 〔马〕

	1				5					10					15	
1	LYS	GLU	SER	PRO	ALA	MET	LYS	PHE	GLU	ARG	GLN	HIS	MET	ASP	SER	15
16	GLY	SER	THR	SER	SER	ASN	PRO	THR	ASN	TYR	CYS	ASN	GLN	MET	MET	30
31	LYS	ARG	ARG	ASN	MET	THR	GLN	GLY	CYS	LYS	PRO	VAL	ASN	THR	PHE	45
46	VAL	HIS	GLU	PRO	LEU	ALA	ASP	VAL	GLN	ALA	ILE	CYS	LEU	GLN	LYS	60
61	ASN	ILE	THR	CYS	LYS	ASN	GLY	GLN	SER	ASN	CYS	TYR	GLN	SER	SER	75
76	SER	SER	MET	HIS	ILE	THR	ASP	CYS	ARG	LEU	THR	SER	GLY	SER	LYS	90
91	TYR	PRO	ASN	CYS	ALA	TYR	GLN	THR	SER	GLN	LYS	GLU	ARG	HIS	ILE	105
106	ILE	VAL	ALA	CYS	GLU	GLY	ASN	PRO	TYR	VAL	PRO	VAL	HIS	PHE	ASP	120
121	ALA	SER	VAL	GLN	THR											135

Horse Pancreatic Ribonuclease.

A. J. Scheffer and J. J. Beintema.

Eur. J. Biochem., **46**, 221—233(1974).

(3) 溶菌酶 (Lysozyme) 〔鸡卵〕

	1				5					10					15	
1	LYS	VAL	PHE	GLY	ARG	CYS	GLU	LEU	ALA	ALA	ALA	MET	LYS	ARG	HIS	15
16	GLY	LEU	ASP	ASN	TYR	ARG	GLY	TYR	SER	LEU	GLY	ASN	TRP	VAL	CYS	30

31	ALA ALA LYS PHE GLU SER ASN PHE ASN THR GLN ALA THR ASN ARG	45
46	ASN THR ASP GLY SER THR ASP TYR GLY ILE LEU GLN ILE ASN SER	60
61	ARG TRP TRP CYS ASP ASN GLY ARG THR PRO GLY SER ARG ASN LEU	75
76	CYS ASN ILE PRO CYS SER ALA LEU LEU SER SER ASP ILE THR ALA	90
91	SER VAL ASN CYS ALA LYS LYS ILE VAL SER ASP GLY ASP GLY MET	105
106	ASN ALA TRP VAL ALA TRP ARG ASN ARG CYS LYS GLY THR ASP VAL	120
121	GLN ALA TRP ILE ARG GLY CYS ARG LEU	135

Note: Disulphide Bridges are Between CYS 6 and 127; CYS 30 and 115; CYS 64 and 80; CYS 76 and 94.

The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme.

R. E. Canfield.

J. Biol. Chem., **238**, 2698—2707(1963); and **240**, 1997—2002(1965).

(4) 血型糖蛋白 (Glycophorin A) 〔人白细胞〕

	1 5 10 15	
1	SER/LEU SER THR THR GLY/GLU VAL ALA MET HIS THR THR THR SER SER SER	15
16	VAL SER LYS SER TYR ILE SER SER GLN THR ASN ASP THR HIS LYS	30
31	ARG ASP THR TYR ALA ALA THR PRO ARG ALA HIS GLU VAL SER GLU	45
46	ILE SER VAL ARG THR VAL TYR PRO PRO GLU GLU GLU THR GLY GLU	60

61	ARG	VAL	GLN	LEU	ALA	HIS	HIS	PHE	SER	GLU	PRO	GLU	ILE	THR	LEU	75
76	ILE	ILE	PHE	GLY	VAL	MET	ALA	GLY	VAL	ILE	GLY	THR	ILE	LEU	LEU	90
91	ILE	SER	TYR	GLY	ILE	ARG	ARG	LEU	ILE	LYS	LYS	SER	PRO	SER	ASP	105
106	VAL	LYS	PRO	LEU	PRO	SER	PRO	ASP	THR	ASP	VAL	PRO	LEU	SER	SER	120
121	VAL	GLU	ILE	GLU	ASN	PRO	GLU	THR	SER	ASP	GLN					135

Primary Structure of Human Erythrocyte Glycophorin A. Isolation and Characterization of Peptides and Complete Amino Acid Sequence.

M. Tomita, H. Furthmayr, and V. T. Marchesi.

Biochemistry, 17, 4756-4770(1978).

(5) 胰蛋白酶 (Typsin)

	1				5					10					15	
1						ILE	VAL	GLY	GLY	TYR	THR	CYS	ALA	ALA		15
16	ASN	SER	VAL ILE	PRO	TYR	GLN	VAL	SER	LEU	ASN	SER	GLY	SER	HIS	PHE	30
31	CYS	GLY	GLY	SER	LEU	ILE	ASN	SER	GLN	TRP	VAL	VAL	SER	ALA	ALA	45
46	HIS	CYS	TYR	LYS	SER	ARG	ILE	GLN	VAL	ARG	LEU	GLY	GLU	HIS	ASN	60
61	ILE	ASP	VAL	LEU	GLU	GLY	ASN	GLU	GLN	PHE	ILE	ASN	ALA	ALA	LYS	75
76	ILE	ILE	THR	HIS	PRO	ASN	PHE	ASN	GLY	ASN	THR	LEU	ASP	ASN	ASP	90
91	ILE	MET	LEU	ILE	LYS	LEU	SER	SER	PRO	ALA	THR	LEU	ASN	SER	ARG	105
106	VAL	ALA	THR	VAL	SER	LEU	PRO	ARG	SER	CYS	ALA	ALA	ALA	GLY	THR	120

121 GLU CYS LEU ILE SER GLY TRP GLY ASN THR LYS SER SER GLY SER 135
136 SER TYR PRO SER LEU LEU GLN CYS LEU LYS ALA PRO VAL LEU SER 150
151 ASP SER SER CYS LYS SER SER TYR PRO GLY GLN ILE THR GLY ASN 165
166 MET ILE CYS VAL GLY PHE LEU GLU GLY GLY LYS ASP SER CYS GLN 180
181 GLY ASP SER GLY GLY PRO VAL VAL CYS ASN GLY GLN LEU GLN GLY 195
196 ILE VAL SER TRP GLY TYR GLY CYS ALA GLN LYS ASN LYS PRO GLY 210
211 VAL TYR THR LYS VAL CYS ASN TYR VAL ASN TRP ILE GLN GLN THR 225
226 ILE ALA (ALA, ASN) 240

Surle Trypsinogene et la Trypsine de Porc.
M. Charles, M. Rovery, A. Guidoni, and P. Desnuelle.
Biochim. Biophys. Acta, **69**, 115—129(1963).

Determination of the Amino Acid Sequence of Porcine Trypsin by Sequenator Analysis.
M. A. Hermodson, L. H. Ericsson, H. Neurath, and K. A. Walsh.
Biochemistry, **12**, 3146—3153(1973).

(6) 碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase)

1 5 10 15
1 AC SER HIS HIS TRP GLY TYR GLY LYS HIS ASN GLY PRO GLU HIS 15
16 TRP HIS LYS ASP PHE PRO ILE ALA LYS GLY GLU ARG GLN SER PRO 30
31 VAL ASP ILE ASP THR HIS THR ALA LYS TYR ASP PRO SER LEU LYS 45

46 PRO LEU SER VAL SER TYR ASP GLN ALA THR SER LEU ARG ILE LEU 60
61 ASN ASN GLY HIS ALA PHE ASN VAL GLU PHE ASP ASP SER GLU ASP 75
76 LYS ALA VAL LEU LYS GLY GLY PRO LEU ASP GLY THR TYR ARG LEU 90
91 ILE GLN PHE HIS PHE HIS TRP GLY SER LEU ASN GLY GLN GLY SER 105
106 GLU HIS THR VAL ASP LYS LYS LYS TYR ALA ALA GLU LEU HIS LEU 120
121 VAL HIS TRP ASN THR LYS TYR GLY ASP PHE GLY LYS ALA VAL GLN 135
136 GLU PRO ASP GLY LEU ALA VAL LEU GLY ILE PHE LEU LYS VAL GLY 150
151 SER ALA PRO LYS GLY LEU GLN LYS VAL VAL ASP VAL LEU ASP SER 165
166 ILE LYS THR LYS GLY LYS SER ALA ASP PHE THR ASN PHE ASP PRO 180
181 ARG GLY LEU LEU PRO GLU SER LEU ASP TYR TRP THR TYR PRO GLY 195
196 SER LEU THR THR PRO PRO LEU LEU GLN CYS VAL THR TRP ILE VAL 210
211 LEU LYS GLU PRO ILE SER VAL SER SER GLU GLN VAL LEU LYS PHE 225
226 ARG LYS LEU ASN PHE ASN GLY GLU GLY GLU PRO GLU GLU LEU MET 240
241 VAL ASP ASN TRP ARG PRO ALA GLN PRO LEU LYS ASN ARG GLN ILE 255
256 LYS ALA SER PHE LYS 270

Human Carbonic Anhydrases. The Complete Primary Structure of the C. Isozyme.
K. T. D. Lin and H. F. Deutsch.
J. Biol. Chem., **249**, 2329—2337(1974).

（7）铁氧还蛋白（Ferredoxin）

	1				5					10					15	
1	ALA	SER	TYR	LYS	VAL	LYS	LEU	VAL	THR	PRO	GLU	GLY	THR	GLN	GLU	15
16	PHE	GLU	CYS	PRO	ASP	ASP	VAL	TYR	ILE	LEU	ASP	HIS	ALA	GLU	GLU	30
31	GLU	GLY	ILE	VAL	LEU	PRO	TYR	SER	CYS	ARG	ALA	GLY	SER	CYS	SER	45
46	SER	CYS	ALA	GLY	LYS	VAL	ALA	ALA	GLY	GLU	VAL	ASN	GLN	SER	ASP	60
61	GLY	SER	PHE	LEU	ASP	ASP	ASP	GLN	ILE	GLU	GLU	GLY	TRP	VAL	LEU	75
76	THR	CYS	VAL	ALA	TYR	ALA	LYS	SER	ASP	VAL	THR	ILE	GLU	THR	HIS	90
91	LYS	GLU	GLU	GLU	LEU	THR	ALA									105

Primary Structure of Alfalfa Ferredoxin.

S. Keresztes-Nagy, F. Perini, and E. Margoliash.

J. Biol. Chem., **244**, 981—995(1969).

(8) 伴刀豆球蛋白A (Concanavalin A)

	1				5					10					15	
1	ALA	ASP	THR	ILE	VAL	ALA	VAL	GLU	LEU	ASP	THR	TYR	PRO	ASN	THR	15
16	ASP	ILE	GLY	ASP	PRO	SER	TYR	PRO	HIS	ILE	GLY	ILE	ASP	ILE	LYS	30
31	SER	VAL	ARG	SER	LYS	LYS	THR	ALA	LYS	TRP	ASN	MET	GLN	ASP	GLY	45
46	LYS	VAL	GLY	THR	ALA	HIS	ILE	ILE	TYR	ASN	SER	VAL	ASP	LYS	ARG	60
61	LEU	SER	ALA	VAL	VAL	SER	TYR	PRO	ASN	ALA	ASP	ALA	THR	SER	VAL	75
76	SER	TYR	ASP	VAL	ASP	LEU	ASN	ASP	VAL	LEU	PRO	GLU	TRP	VAL	ARG	90

91	VAL	GLY	LEU	SER	ALA	SER	THR	GLY	LEU	TYR	LYS	GLU	THR	ASN	THR	105
106	ILE	LEU	SER	TRP	SER	PHE	THR	SER	LYS	LEU	LYS	SER	ASN	SER	THR	120
121	HIS	GLN	THR	ASP	ALA	LEU	HIS	PHE	MET	PHE	ASN	GLN	PHE	SER	LYS	135
136	ASP	GLN	LYS	ASP	LEU	ILE	LEU	GLN	GLY	ASP	ALA	THR	THR	GLY	THR	150
151	ASP	GLY	ASN	LEU	GLU	LEU	THR	ARG	VAL	SER	SER	ASN	GLY	SER	PRO	165
166	GLU	GLY	SER	SER	VAL	GLY	ARG	ALA	LEU	PHE	TYR	ALA	PRO	VAL	HIS	180
181	ILE	TRP	GLU	SER	SER	ALA	THR	VAL	SER	ALA	PHE	GLU	ALA	THR	PHE	195
196	ALA	PHE	LEU	ILE	LYS	SER	PRO	ASP	SER	HIS	PRO	ALA	ASP	GLY	ILE	210
211	ALA	PHE	PHE	ILE	SER	ASN	ILE	ASP	SER	SER	ILE	PRO	SER	GLY	SER	225
226	THR	GLY	ARG	LEU	LEU	GLY	LEU	PHE	PRO	ASP	ALA	ASN				240

The Covalent and Three-dimensional Structure of Concanavalin A. I. Amino Acid Sequence of Cyanogen Bromide Fragments F1 and F2.

J. L. Wang, B. A. Cunningham, M. J. Waxdal, and G. M. Edelman.

J. Biol. Chem., **250**, 1490-1502(1975).

And

II. Amino Acid Sequence of Cyanogen Bromide Fragment F3.

B. A. Cunningham, J. L. Wang, M. J. Waxdal, and G. M. Edelman.

J. Biol. Chem., **250**, 1503-1512(1975).

(9) 醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase)

	1				5					10					15	
1	AC	SER	THR	ALA	GLY	LYS	VAL	ILE	LYS	CYS	LYS	ALA	ALA	VAL	LEU	15
16	TRP	GLU	GLU	LYS	LYS	PRO	PHE	SER	ILE	GLU	GLU	VAL	GLU	VAL	ALA	30
31	PRO	PRO	LYS	ALA	HIS	GLU	VAL	ARG	ILE	LYS	MET	VAL	ALA	THR	GLY	45
46	ILE	CYS	ARG	SER	ASP	ASP	HIS	VAL	VAL	SER	GLY	THR	LEU	VAL	THR	60
61	PRO	LEU	PRO	VAL	ILE	ALA	GLY	HIS	GLU	ALA	ALA	GLY	ILE	VAL	GLU	75
76	SER	ILE	GLY	GLU	GLY	VAL	THR	THR	VAL	ARG	PRO	GLY	ASP	LYS	VAL	90
91	ILE	PRO	LEU	PHE	THR	PRO	GLN	CYS	GLY	LYS	CYS	ARG	VAL	CYS	LYS	105
106	HIS	PRO	GLU	GLY	ASN	PHE	CYS	LEU	LYS	ASN	ASP	LEU	SER	MET	PRO	120
121	ARG	GLY	THR	MET	GLN	ASP	GLY	THR	SER	ARG	PHE	THR	CYS	ARG	GLY	135
136	LYS	PRO	ILE	HIS	HIS	PHE	LEU	GLY	THR	SER	THR	PHE	SER	GLN	TYR	150
151	THR	VAL	VAL	ASP	GLU	ILE	SER	VAL	ALA	LYS	ILE	ASP	ALA	ALA	SER	165
166	PRO	LEU	GLU	LYS	VAL	CYS	LEU	ILE	GLY	CYS	GLY	PHE	SER	THR	GLY	180
181	TYR	GLY	SER	ALA	VAL	LYS	VAL	ALA	LYS	VAL	THR	GLN	GLY	SER	THR	195
196	CYS	ALA	VAL	PHE	GLY	LEU	GLY	GLY	VAL	GLY	LEU	SER	VAL	ILE	MET	210
211	GLY	CYS	LYS	ALA	ALA	GLY	ALA	ALA	ARG	ILE	ILE	GLY	VAL	ASP	ILE	225
226	ASN	LYS	ASP	LYS	PHE	ALA	LYS	ALA	LYS	GLU	VAL	GLY	ALA	THR	GLU	240
241	CYS	VAL	ASN	PRO	GLN	ASP	TYR	LYS	LYS	PRO	ILE	GLN	GLU	VAL	LEU	255
256	THR	GLU	MET	SER	ASN	GLY	GLY	VAL	ASP	PHE	SER	PHE	GLU	VAL	ILE	270
271	GLY	ARG	LEU	ASP	THR	MET	VAL	THR	ALA	LEU	SER	CYS	CYS	GLN	GLU	285

286 ALA TYR GLY VAL SER VAL ILE VAL GLY VAL PRO PRO ASP SER GLN 300
301 ASN LEU SER MET ASN PRO MET LEU LEU LEU SER GLY ARG THR TRP 315
316 LYS GLY ALA ILE PHE GLY GLY PHE LYS SER LYS ASP SER VAL PRO 330
331 LYS LEU VAL ALA ASP PHE MET ALA LYS LYS PHE ALA LEU ASP PRO 345
346 LEU ILE THR HIS VAL LEU PRO PHE GLU LYS ILE ASN GLU GLY PHE 350
351 ASP LEU LEU ARG SER GLY GLU SER ILE ARG THR ILE LEU THR PHE 365

Note: This is the Sequence for the E-chain.

Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. The Primary Structure of the Protein Chain of the Ethanol-Active Isoenzyme.

H. Jōrnvall.

Eur. J. Biochem., **16**, 25-40(1970).

Note: The S-chain Differs from the Above at Positions 17, 94, 101, 110, 366, the Residues in These Positions are GLN. ILE, SER, LEU, LYS Respectively. Residue 115 Also Differs but the Substitution Has not Beer Firmly Established.

Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. On the Primary Structures of the Isoenzymes.

H. Jōrnvall.

Eur. J. Biochem., **16**, 41—49(1970).

(10) 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

	1				5					10					15	
1	VAL	LYS	VAL	GLY	VAL	ASP	GLY	PHE	GLY	ARG	ILE	GLY	ARG	LEU	VAL	15
16	THR	ARG	ALA	ALA	PHE	ASN	SER	GLY	LYS	VAL	ASP	ILE	VAL	ALA	ILE	30
31	ASN	ASP	PRO	PHE	ILE	ASP	LEU	HIS	TYR	MET	VAL	TYR	MET	PHE	GLU	45
46	TYR	ASP	SER	THR	HIS	GLY	LYS	PHE	HIS	GLY	THR	VAL	LYS	ALA	GLU	60
61	ASP	GLY	LYS	LEU	VAL	ILE	ASP	GLY	LYS	ALA	ILE	THR	ILE	PHE	GLN	75
76	GLU	ARG	ASP	PRO	ALA	ASN	ILE	LYS	TRP	GLY	ASP	ALA	GLY	THR	ALA	90
91	TYR	VAL	VAL	GLU	SER	THR	GLY	VAL	PHE	THR	THR	MET	GLU	LYS	ALA	105
106	GLY	ALA	HIS	LEU	LYS	GLY	GLY	ALA	LYS	ARG	VAL	ILE	ILE	SER	ALA	120
121	PRO	SER	ALA	ASP	ALA	PRO	MET	PHE	VAL	MET	GLY	VAL	ASN	HIS	GLU	135
136	LYS	TYR	ASP	ASN	SER	LEU	LYS	ILE	VAL	SER	ASN	ALA	SER	CYS	THR	150
151	THR	ASN	CYS	LEU	ALA	PRO	LEU	ALA	LYS	VAL	ILE	HIS	ASP	HIS	PHE	165
166	GLY	ILE	VAL	GLU	GLY	LEU	MET	THR	THR	VAL	HIS	ALA	ILE	THR	ALA	180
181	THR	GLN	LYS	THR	VAL	ASP	GLY	PRO	SER	GLY	LYS	LEU	TRP	ARG	ASP	195
196	GLY	ARG	GLY	ALA	ALA	GLN	ASN	ILE	ILE	PRO	ALA	SER	THR	GLY	ALA	210
211	ALA	LYS	ALA	VAL	GLY	LYS	VAL	ILE	PRO	GLU	LEU	ASP	GLY	LYS	LEU	225
226	THR	GLY	MET	ALA	PHE	ARG	VAL	PRO	THR	PRO	ASN	VAL	SER	VAL	VAL	240
241	ASP	LEU	THR	CYS	ARG	LEU	GLU	LYS	PRO	ALA	LYS	TYR	ASP	ASP	ILE	255
256	LYS	LYS	VAL	VAL	LYS	GLN	ALA	SER	GLU	GLY	PRO	LEU	LYS	GLY	ILE	270
271	LEU	GLY	TYR	THR	GLU	ASP	GLN	VAL	VAL	SER	CYS	ASP	PHE	ASN	ASP	285
286	SER	THR	HIS	SER	SER	THR	PHE	ASP	ALA	GLY	ALA	GLY	ILE	ALA	LEU	300

301 ASN ASP HIS PHE VAL LYS LEU ILE SER TRP TYR ASP ASN GLU PHE 315

316 GLY TYR SER ASN ARG VAL VAL ASP LEU MET VAL HIS MET ALA SER 330

331 LYS GLU 345

Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from Pig Muscle.

J. I. Harris and R. N. Perham.

Nature, **219**, 1025—1028(1968).

(11) 磷酸丙糖异构酶 (Triose phosphate isomerase)

	1				5					10					15	
1	ALA	PRO	SER	ARG	LYS	PHE	PHE	VAL	GLY	GLY	ASN	TRP	LYS	MET	ASN	15
16	GLY	ARG	LYS	LYS	ASN	LEU	GLY	GLU	LEU	ILE	THR	THR	LEU	ASN	ALA	30
31	ALA	LYS	VAL	PRO	ALA	ASP	THR	GLU	VAL	VAL	CYS	ALA	PRO	PRO	THR	45
46	ALA	TYR	ILE	ASP	PHE	ALA	ARG	GLN	LYS	LEU	ASP	PRO	LYS	ILE	ALA	60
61	VAL	ALA	ALA	GLN	ASN	CYS	TYR	LYS	VAL	THR	ASN	GLY	ALA	PHE	THR	75
76	GLY	GLU	ILE	SER	PRO	GLY	MET	ILE	LYS	ASP	CYS	GLY	ALA	THR	TRP	90
91	VAL	VAL	LEU	GLY	HIS	SER	GLU	ARG	ARG	HIS	VAL	PHE	GLY	GLU	SER	105
106	ASP	GLU	LEU	ILE	GLY	GLN	LYS	VAL	ALA	HIS	ALA	LEU	SER	GLU	GLY	120
121	LEU	GLY	VAL	ILE	ALA	CYS	ILE	GLY	GLU	LYS	LEU	ASP	GLU	ARG	GLU	135
136	ALA	GLY	ILE	THR	GLU	LYS	VAL	VAL	PHE	GLU	GLN	THR	LYS	VAL	ILE	150
151	ALA	ASP	ASN	VAL	LYS	ASP	TRP	SER	LYS	VAL	VAL	LEU	ALA	TYR	GLU	165

166 PRO VAL TRP ALA ILE GLY THR GLY LYS THR ALA THR PRO GLN GLN 180
181 ALA GLN GLU VAL HIS GLU LYS LEU ARG GLY TRP LEU LYS SER ASN 195
196 VAL SER ASP ALA VAL ALA GLN SER THR ARG ILE ILE TYR GLY GLY 210
211 SER VAL THR GLY ALA THR CYS LYS GLU LEU ALA SER GLN PRO ASP 225
226 VAL ASP GLY PHE LEU VAL GLY GLY ALA SER LEU LYS PRO GLU PHE 240
241 VAL ASP ILE ILE ASN ALA LYS GLN

The Amino Acid Sequence of Rabbit Muscle Triose Phosphate Isomerase.
P. H. Corran and S. G. Waley.
FEBS Letters, 30, 97—99(1973)
The Tryptic Peptides of Rabbit Triose Phosphate Isomerase.
P. H. Corran and S. G. Waley.
Biochem. J., 139, 1—10(1974).
The Amino Acid Sequence of Rabbit Muscle muscle Triose Phosphate Isomerase.
P. H. Corran and S. G. Waley.
Biochem. J., 145, 335—344(1975).

(12) 天冬氨酸转氨甲酰酶 (Aspartate aminotransferase)

1 5 10 15
1 ALA PRO PRO SER VAL PHE ALA GLU VAL PRO GLN ALA GLN PRO VAL 15
16 LEU VAL PHE LYS LEU ILE ALA ASP PHE ARG GLU ASP PRO ASP PRO 30

31	ARG	LYS	VAL	ASN	LEU	GLY	VAL	GLY	ALA	TYR	ARG	THR	ASP	ASP	CYS	45
46	GLN	PRO	TRP	VAL	LEU	PRO	VAL	VAL	ARG	LYS	VAL	GLU	GLN	ARG	ILE	60
61	ALA	ASN	ASP	SER	SER	LEU	ASN	HIS	GLU	TYR	LEU	PRO	ILE	LEU	GLY	75
76	LEU	ALA	GLU	PHE	ARG	THR	CYS	ALA	SER	ARG	LEU	ALA	LEU	GLY	ASP	90
91	ASP	SER	PRO	ALA	LEU	GLN	GLU	LYS	ARG	VAL	GLY	GLY	VAL	GLN	SER	105
106	LEU	GLY	GLY	THR	GLY	ALA	LEU	ARG	ILE	GLY	ALA	GLU	PHE	LEU	ALA	120
121	ARG	TRP	TYR	ASN	GLY	THR	ASN	ASN	LYS	ASP	THR	PRO	VAL	TYR	VAL	135
136	SER	SER	PRO	THR	TRP	GLU	ASN	HIS	ASP	GLY	VAL	PHE	THR	THR	ALA	150
151	GLY	PHE	LYS	ASP	ILE	ARG	SER	TYR	ARG	TYR	TRP	ASP	THR	GLU	LYS	165
166	ARG	GLY	LEU	ASP	LEU	GLN	GLY	PHE	LEU	SER	ASP	LEU	GLU	ASN	ALA	180
181	PRO	GLU	PHE	SER	ILE	PHE	VAL	LEU	HIS	ALA	CYS	ALA	HIS	ASN	PRO	195
196	THR	GLY	THR	ASP	PRO	THR	PRO	GLU	GLN	TRP	LYS	GLN	ILE	ALA	SER	210
211	VAL	MET	LYS	ARG	ARG	PHE	LEU	PHE	PRO	PHE	PHE	ASP	SER	ALA	TYR	225
226	GLN	GLY	PHE	ALA	SER	GLY	ASN	LEU	GLU	LYS	ASP	ALA	TRP	ALA	ILE	240
241	ARG	TYR	PHE	VAL	SER	GLU	GLY	PHE	GLU	LEU	PHE	CYS	ALA	GLN	SER	255
256	PHE	SER	LYS	ASN	PHE	GLY	LEU	TYR	ASN	GLU	ARG	VAL	GLY	ASN	LEU	270
271	THR	VAL	VAL	ALA	LYS	GLU	PRO	ASP	SER	ILE	LEU	ARG	VAL	LEU	SER	285
286	GLN	MET	GLU	LYS	ILE	VAL	ARG	VAL	THR	TRP	SER	ASN	PRO	PRO	ALA	300
301	GLN	GLY	ALA	ARG	ILE	VAL	ALA	ARG	THR	LEU	SER	ASP	PRO	GLU	LEU	315
316	PHE	HIS	GLU	TRP	THR	GLY	ASN	VAL	LYS	THR	MET	ALA	ASP	ARG	ILE	330

331 LEU SER MET ARG SER GLU LEU ARG ALA ARG LEU GLU ALA LEU LYS 345
346 THR PRO GLY THR TRP ASN HIS ILE THR ASP GLN ILE GLY MET PHE 360
361 SER PHE THR GLY LEU ASN PRO LYS GLN VAL GLU TYR LEU ILE ASN 375
376 GLU LYS HIS ILE TYR LEU LEU PRO SER GLY ARG ILE ASN MET CYS 390
391 GLY LEU THR THR LYS ASN LEU ASP TYR VAL ALA THR SER ILE HIS 405
406 GLU ALA VAL THR LYS ILE GLN 420

The Complete Amino Acid Sequence of Cytoplasmic Aspartate Aminotransferase from Pig Heart.

Yu. A. Ovchinnikov, C. A. Egorov, N. A. Aldanova, M. Yu. Feigina, V. M. Lipkin, N. G. Abdulaev, E. V. Grishin, A. P. Kiselev, N. N. Modyanov, A. E. Braunstein, O. L. Polyanovsky, and V. V. Nosikov.

FEBS Letters, **29**, 31—34(1973).

The Primary Structure of Aspartate Aminotransferase from Pig Heart Muscle Determined in Part Using a Protease with Specificity for Lysine.

S. Doonan, H. J. Doonan, R. Hanford, C. A. Vernon, J. M. Walker, F. Bossa, D. Barra, M. Carloni, P. Fasella, F. Riva, and P. L. Walton.

FEBS Letters, **38**, 229—233(1974).

(13) 腺苷酸激酶 (Adenylate kinase)

	1				5					10					15	
1	AC	MET	GLU	GLU	LYS	LEU	LYS	LYS	SER	LYS	ILE	ILE	PHE	VAL	VAL	15
16	GLY	GLY	PRO	GLY	SER	GLY	LYS	GLY	THR	GLN	CYS	GLU	LYS	ILE	VAL	30
31	GLN	LYS	TYR	GLY	TYR	THR	HIS	LEU	SER	THR	GLY	ASP	LEU	LEU	ARG	45
46	ALA	GLU	VAL	SER	SER	GLY	SER	ALA	ARG	GLY	LYS	MET	LEU	SER	GLU	60
61	ILE	MET	GLU	LYS	GLY	GLN	LEU	VAL	PRO	LEU	GLU	THR	VAL	LEU	ASP	75
76	MET	LEU	ARG	ASP	ALA	MET	VAL	ALA	LYS	VAL	ASP	THR	SER	LYS	GLY	90
91	PHE	LEU	ILE	ASP	GLY	TYR	PRO	ARG	GLU	VAL	LYS	GLN	GLY	GLU	GLU	105
106	PHE	GLU	ARG	LYS	ILE	GLY	GLN	PRO	THR	LEU	LEU	LEU	TYR	VAL	ASP	120
121	ALA	GLY	PRO	GLU	THR	MET	THR	LYS	ARG	LEU	LEU	LYS	ARG	GLY	GLU	135
136	THR	SER	GLY	ARG	VAL	ASP	ASP	ASN	GLU	GLU	THR	ILE	LYS	LYS	ARG	150
151	LEU	GLU	THR	TYR	TYR	LYS	ALA	THR	GLU	PRO	VAL	ILE	ALA	PHE	TYR	165
166	GLU	LYS	ARG	GLY	ILE	VAL	ARG	LYS	VAL	ASN	ALA	GLU	GLY	SER	VAL	180
181	ASP	ASP	VAL	PHE	SER	GLN	VAL	CYS	THR	HIS	LEU	ASP	THR	LEU	LYS	195

The Amino Acid Sequence of Porcine Adenylate Kinase from Skeletal Muscle.

A. Heil, G. Muller, L. Noda, T. Pinder, H. Schirmer, I. Schirmer, and I. von Zabern.

Eur. J. Biochem., 43, 131—144(1974).

(14) 嗜热菌蛋白酶 (Thermolysin)

	1				5					10					15	
1	ILE	THR	GLY	THR	SER	THR	VAL	GLY	VAL	GLY	ARG	GLY	VAL	LEU	GLY	15
16	ASP	GLN	LYS	ASN	ILE	ASN	THR	THR	TYR	SER	THR	TYR	TYR	TYR	LEU	30
31	GLN	ASP	ASN	THR	ARG	GLY	ASP	GLY	ILE	PHE	THR	TYR	ASP	ALA	LYS	45
46	TYR	ARG	THR	THR	LEU	PRO	GLY	SER	LEU	TRP	ALA	ASP	ALA	ASP	ASN	60
61	GLN	PHE	PHE	ALA	SER	TYR	ASP	ALA	PRO	ALA	VAL	ASP	ALA	HIS	TYR	75
76	TYR	ALA	GLY	VAL	THR	TYR	ASP	TYR	TYR	LYS	ASN	VAL	HIS	ASN	ARG	90
91	LEU	SER	TYR	ASP	GLY	ASN	ASN	ALA	ALA	ILE	ARG	SER	SER	VAL	HIS	105
106	TYR	SER	GLN	GLY	TYR	ASN	ASN	ALA	PHE	TRP	ASN	GLY	SER	GLU	MET	120
121	VAL	TYR	GLY	ASP	GLY	ASP	GLY	GLN	THR	PHE	ILE	PRO	LEU	SER	GLY	135
136	GLY	ILE	ASP	VAL	VAL	ALA	HIS	GLU	LEU	THR	HIS	ALA	VAL	THR	ASP	150
151	TYR	THR	ALA	GLY	LEU	ILE	TYR	GLN	ASN	GLU	SER	GLY	ALA	ILE	ASN	165
166	GLU	ALA	ILE	SER	ASP	ILE	PHE	GLY	THR	LEU	VAL	GLU	PHE	TYR	ALA	180
181	ASN	LYS	ASN	PRO	ASP	TRP	GLU	ILE	GLY	GLU	ASP	VAL	TYR	THR	PRO	195
196	GLY	ILE	SER	GLY	ASP	SER	LEU	ARG	SER	MET	SER	ASP	PRO	ALA	LYS	210
211	TYR	GLY	ASP	PRO	ASP	HIS	TYR	SER	LYS	ARG	TYR	THR	GLY	THR	GLN	225
226	ASP	ASN	GLY	GLY	VAL	HIS	ILE	ASN	SER	GLY	ILE	ILE	ASN	LYS	ALA	240
241	ALA	TYR	LEU	ILE	SER	GLN	GLY	GLY	THR	HIS	TYR	GLY	VAL	SER	VAL	255
256	VAL	GLY	ILE	GLY	ARG	ASP	LYS	LEU	GLY	LYS	ILE	PHE	TYR	ARG	ALA	270
271	LEU	THR	GLN	TYR	LEU	THR	PRO	THR	SER	ASN	PHE	SER	GLN	LEU	ARG	285

286 ALA ALA ALA VAL GLN SER ALA THR ASP LEU TYR GLY SER THR SER 300
301 GLX GLX VAL ALA SER VAL LYS GLN ALA PHE ASP ALA VAL GLY VAL 315
316 LYS 330

The Amino Acid Sequence of Thermolysin.

K. Titani, M. A. Hermodson, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, and H. Neurath.

Nature (*New Biol.*), **238**, 35—37(1972).

(15) 羧肽酶A (Carboxypeptidase A)

	1				5					10					15	
1	ALA	ARG	SER	THR	ASN	THR	PHE	ASN	TYR	ALA	THR	TYR	HIS	THR	LEU	15
16	ASP	GLU	ILE	TYR	ASP	PHE	MET	ASP	LEU	LEU	VAL	ALA	GLN	HIS	PRO	30
31	GLU	LEU	VAL	SER	LYS	LEU	GLN	ILE	GLY	ARG	SER	TYR	GLU	GLY	ARG	45
46	PRO	ILE	TYR	VAL	LEU	LYS	PHE	SER	THR	GLY	GLY	SER	ASN	ARG	PRO	60
61	ALA	ILE	TRP	ILE	ASP	LEU	GLY	ILE	HIS	SER	ARG	GLU	TRP	ILE	THR	75
76	GLN	ALA	THR	GLY	VAL	TRP	PHE	ALA	LYS	LYS	PHE	THR	GLU	ASN	TYR	90
91	GLY	GLN	ASN	PRO	SER	PHE	THR	ALA	ILE	LEU	ASP	SER	MET	ASP	ILE	105
106	PHE	LEU	GLU	ILE	VAL	THR	ASN	PRO	ASN	GLY	PHE	ALA	PHE	THR	HIS	120
121	SER	GLU	ASN	ARG	LEU	TRP	ARG	LYS	THR	ARG	SER	VAL	THR	SER	SER	135
136	SER	LEU	CYS	VAL	GLY	VAL	ASP	ALA	ASN	ARG	ASN	TRP	ASP	ALA	GLY	150
151	PHE	GLY	LYS	ALA	GLY	ALA	SER	SER	SER	PRO	CYS	SER	GLU	THR	TYR	165

166	HIS	GLY	LYS	TYR	ALA	ASN	SER	GLU	VAL	GLU	VAL	LYS	SER	ILE VAL	VAL	180
181	ASP	PHE	VAL	LYS	ASN	HIS	GLY	ASN	PHE	LYS	ALA	PHE	LEU	SER	ILE	195
196	HIS	SER	TYR	SER	GLN	LEU	LEU	LEU	TYR	PRO	TYR	GLY	TYR	THR	THR	210
211	GLN	SER	ILE	PRO	ASP	LYS	THR	GLU	LEU	ASN	GLN	VAL	ALA	LYS	SER	225
226	ALA	VAL	ALA GLU	ALA	LEU	LYS	SER	LEU	TYR	GLY	THR	SER	TYR	LYS	TYR	240
241	GLY	SER	ILE	ILE	THR	THR	ILE	TYR	GLN	ALA	SER	GLY	GLY	SER	ILE	255
256	ASP	TRP	SER	TYR	ASN	GLN	GLY	ILE	LYS	TYR	SER	PHE	THR	PHE	GLU	270
271	LEU	ARG	ASP	THR	GLY	ARG	TYR	GLY	PHE	LEU	LEU	PRO	ALA	SER	GLN	285
286	ILE	ILE	PRO	THR	ALA	GLN	GLU	THR	TRP	LEU	GLY	VAL	LEU	THR	ILE	300
301	MET	GLU	HIS	THR	VAL LEU	ASN	ASN									315

Note: This is the Alpha Form.

The Amino Acid Sequence of Bovine Carboxypeptidase A.

R. A. Bradshaw, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, and H. Neurath.

Proc. Natn. Acad. Sci. U. S. A., **63**, 1389—1394(1969).

参考文献

1. Allen, G.: Sequencing of Proteins and Peptides, 1981.
2. Croft, L. R.: Handbook of Protein Sequence Analysis John Wiley, 1980.
3. Timasheif, S. N.: Enzyme Structure Metkods in Enzymology vol 91, Fart1. Academic Press, 1983.
4. Walker, J. M. & Gaastra, W.: Techniques in Molecular Biology Croom Helm, 1983.

第三章　二级结构

蛋白质的二级结构（Secondary structure）是指多肽链骨架的规则的排列，而不涉及侧链的类型和构象。

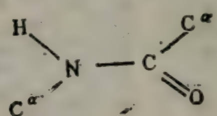
二级结构是靠肽链中的氨基(—NH_2)与羰基（>C=O）之间所形成的氢键（hydrogen bond）而得到稳定的

>N—H……O=C<。

蛋白质的空间结构包括二级结构、超二级结构、结构域及三级结构，主要是采用X–射线衍射（X–ray diffraction）测定的。有关蛋白质晶体结构的研究方法，请参考李家瑶编著的《生物大分子晶体结构研究》一书(参考文献6)。

一、肽键(peptide bond)

在蛋白质中氨基酸靠肽键连接成多肽，肽键的结构如下：



Pauling等（1951)测定了肽的键长(bond length）及键角(bond angle)，Momany于1975年又重新进行了测定，肽的键

长和键角如图3·1。

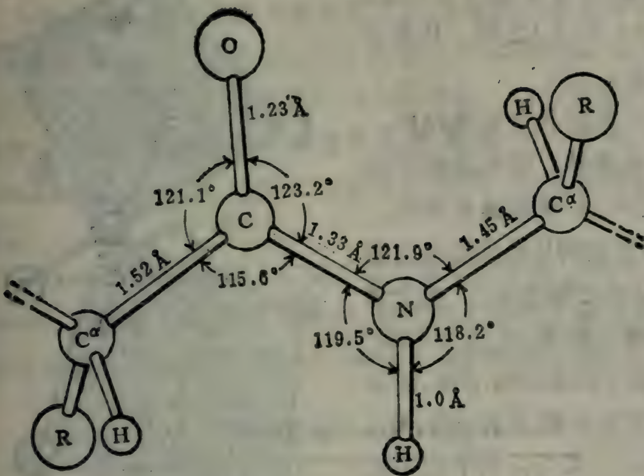
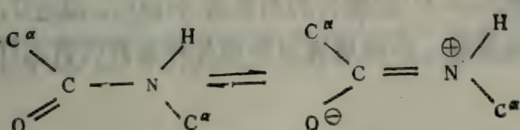


图3·1 肽键的键长和键角

Pauling等发现C′原子与N原子之间的距离比正常的C—N键要短10%，或0.15Å，并且C′—O双键比正常的醛或酮中的双键长0.012Å，Pauling解释这个现象是由于下列两个极端结构之间的共振（resonance）引起的。



I　　　　　　　　II

C′—N键的键长如下：



由此可见，肽键的键长(1.325 Å)介于单键(1.487 Å)与双键(1.27 Å)之间，具有双键的性质。

由于肽键具有双键性质，不能自由旋转，因此肽键形成平面(图3·2)。根据键长测定，由结构I和结构II形成的杂交结构中I:II的比例为3:2。热力学数据表明共振能约为20kcal/mole。由于结构II为平面，故杂交结构亦为平面，C_i^α，C'_i，O_i，N_{i+1}，H_{i+1}，C_{i+1}^α 六个原子均位于同一个平面上。

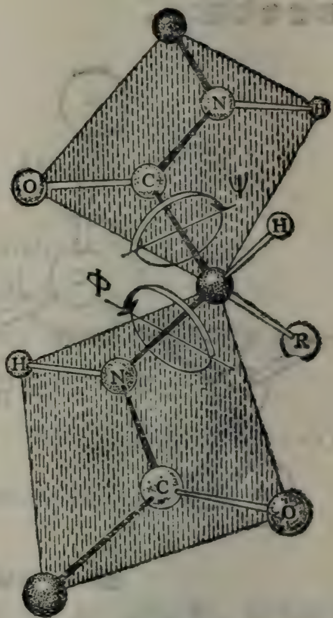


图3·2　两个肽平面通过α-C原子的结构

肽链的骨架可以用每个残基的二面角(dihedral angle)来描述。两个肽链平面由α—C原子的四面体键相连接，C_α—N单键及C_α—C′单键可以自由旋转。围绕C_α—N键旋转的角称为φ(phi)，围绕C_α—C′键旋转的角称为ψ(psi)。通过C_α—N键及C_α—C′键的旋转，多肽链可以形成各种各样的折迭(folding)方式。

二、Ramachandran图

如果肽键为平面，则多肽链的每个残基只有两个自由度，即沿C_α—N轴φ角或沿C_α—C′轴ψ角转动。但是多肽链的二面

角的转动在立体化学上受到约束。印度 Ramachandran 等(1963)研究了多肽链立体化学问题，他们提出肽键平面虽然可以沿 φ、ψ 轴旋转，但并非所产生的所有肽链构象都是立体化学所允许的，有若干二面角（φ，ψ）所决定的肽链构象是立体化学所不允许的，在天然蛋白质中不存在。这主要是由下列原则决定的：在相邻的两个肽键平面的构象中，非键合原子(nonbonded atom）之间的接触有些障碍，即能量是否达到最低。

Ramachandran 等人将原子看作简单的硬球（hard-sphere model)，根据 Van der Waals 半径可以确定非键合原子之间的最小接触距离（minimum contact distance)（表3·1)。

表3·1　　非键合原子的最小接触距离

	C	N	O	H
C	3.20 (3.00)	2.90 (2.80)	2.80 (2.70)	2.40 (2.20)
N		2.70 (2.60)	2.70 (2.60)	2.40 (2.20)
O			2.70 (2.60)	2.40 (2.20)
H				2.20 (1.90)

（上行为 van der Waals 半径，下行括号内为Ramachandran测得的最小接触距离）

根据非键合原子之间的最小接触距离，确定哪些二面角(φ，ψ）所决定的相邻的二肽单位的构象是立体化学允许的，哪些是不允许的，用φ对ψ作图，得到 φψ 图（φψmap)，或者称为Ramachandran图(图3·3)。

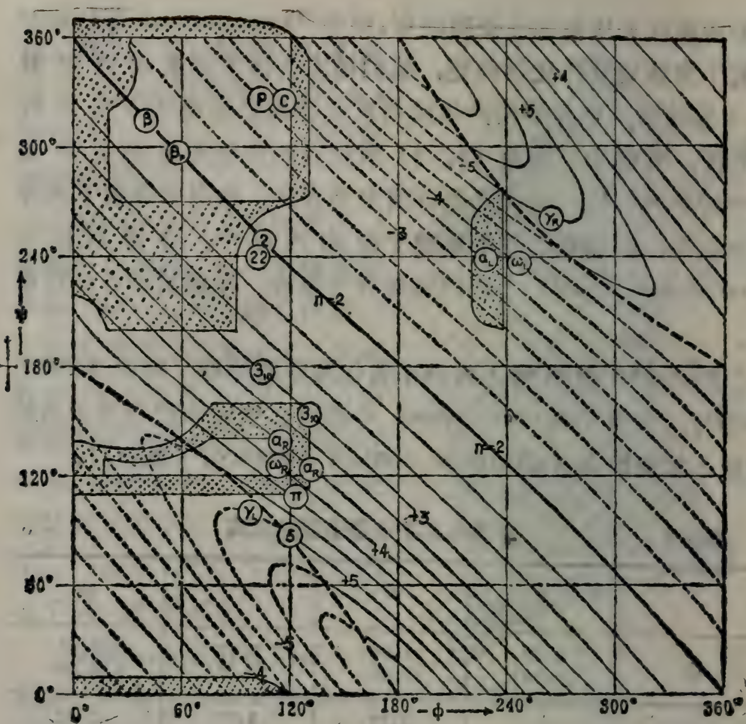


图3·3　Ramachandran图(φψ图)

Ramachandran 等将13种球蛋白的2500个残基的主链的二面角作出分布图，如图3·4所示。由图中可以看到两个最密集的区域：一个是最大的密度接近(－60°，－60°)，它反映球蛋白的右手α-螺旋的位置，另一个最大的密度位于(－90°，＋120°)，相当于β折迭的区域。

在Ramachandran图的实线封闭区为允许区，在此区内任何二面角所决定的肽链构象都是立体化学允许的。因此，在此肽链构象中，非键合原子之间的距离不小于标准接触距离，二者

之间没有斥力，构象的能量最低，所以这种构象是最稳定的。

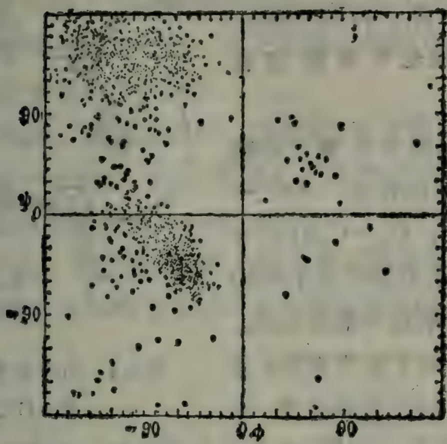
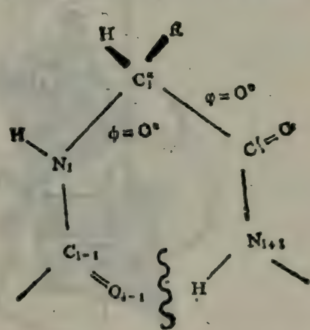


图3·4　13种蛋白质2500个残基的主链二面角的分布图

位于允许区的有右手α螺旋，平行β折迭，反平行β折迭及胶原螺旋。

在 φψ 图虚线以外均为不允许区，因为在这些肽链的构象中，非键合原子之间的距离小于极限值（比标准接触距离小0.1—0.2Å），二者之间产生很大的斥力，构成的能量很高，所以这些肽链的构象很不稳定。虚线以内为部分允许区，在此区内φψ所决定的肽链构象是立体化学允许的，但是不够稳定，如3_{10}螺旋，π-螺旋，α_L螺旋等。



例如，C_i^a 的φ角为0°，ψ角为0°时，则羰基氧原子O_{i-1}与N_{i+1}上的H原子将相互重迭，显然这种构象是不可能存在的。

图3·5是由α-C原子连结的两个肽平面的构象，当C_a—N角(φ)=0°，C_a—C角(ψ)=0°时，由于O原子与H原子间的斥力，这种构象是不能存在的。

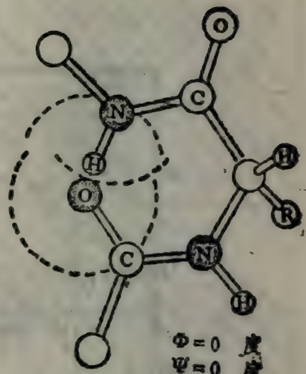


图3.5 两个肽平面Φ=O°，Ψ=O°时的构象

图3·2为两个肽平面的φ角及ψ角都处于180°时的位置，即完全伸展的构象。如果φ角或ψ角旋转到一定程度，非键合原子接触太近的时候，这种位置就不被允许了。图3.6左面的图表示羰基氧原子在φ=0°，ψ=180°时受到的最大限制，右面的图表示当φ=180°，ψ=0°时氢原子受到的最大限制。这两种构象都是立体化学所不允许的。

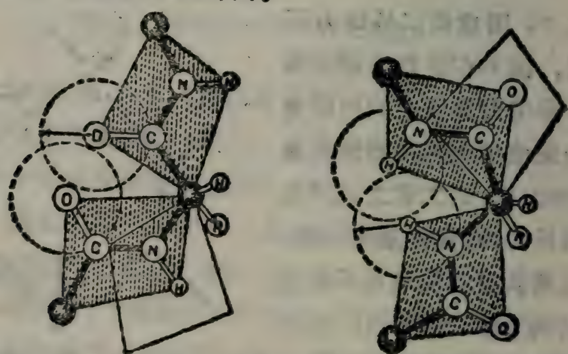


图3·6 左：φ=0°，ψ=180°时羰基氧原子所受到的最大限制
右：当φ=180°，ψ=0°时H原子受到的最大限制

由甘氨酸组成的肽链由于α-C原子上没有侧链，它在Ramachandran图上所占据的面积最大，达到22.5%，而由丙氨酸组成的肽链在φψ图上所占据的面积就小多了（约7.5%）。缬氨酸及异亮氨酸的侧链更复杂，由它们组成的肽链在图上所占据的面积只有总面积的5%而已。

为了便于理解，我们把各种二级结构(见下面各节)，如右手α-螺旋，左手α-螺旋，平行β折迭片，反平行β折迭片，扭曲的β折迭片，胶原螺旋等在Ramachandran图上的位置列于图3·7中。由此可见，它们在φψ图上所占据的范围是很有限的，也就是说多肽链骨架的构象在其柔性(flexibility)上是很有限的。

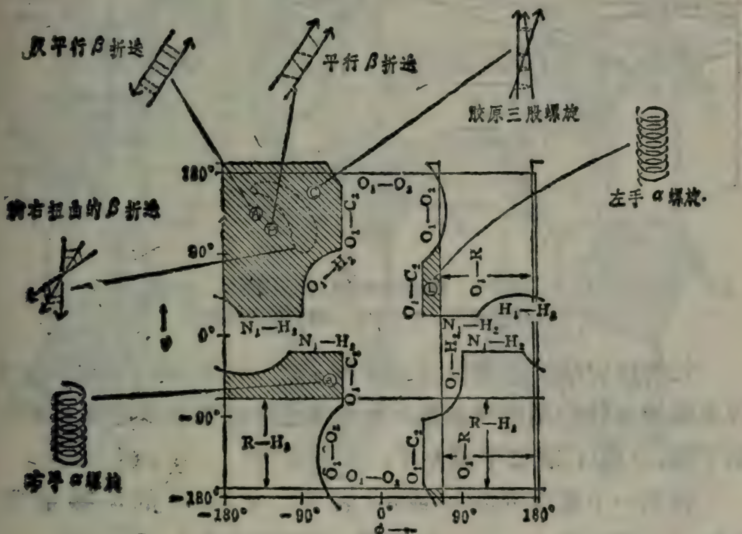


图3·7 Ramachandran图，示α螺旋（右手，左手），β折迭(平行，反平行，扭曲)，胶原螺旋等的位置

三、螺旋

1. α-螺旋（α-helix）

Pauling 与 Corey（1951）用X-射线衍射技术研究多肽链的结构，发现其中存在α-螺旋，肽链折迭成螺旋形状。α-螺旋的螺距（pitch）为5.4Å，螺旋每绕一圈(360°）为3.6个氨基酸残基（重复单位），每个重复单位沿螺旋轴上升1.5Å（图3·8）。

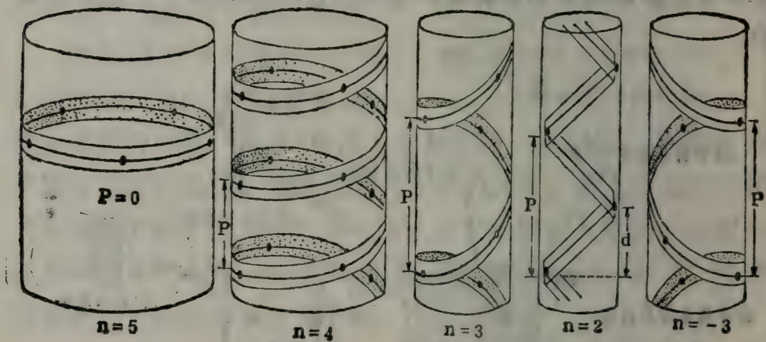


图3·8 螺旋(helix)的示意图
(P=螺距，n=旋转一圈的氨基酸数)

任何螺旋结构都可以用三个符号s、m及r(或l）来表示，s代表螺旋每转一圈的残基数，m代表由氢键连接所形成的环的原子数，r或l代表右手或左手。

因此一个螺旋可以$s_m r$或$s_m l$表示。如右手的α-螺旋为$3.6_{13}r$，或$\alpha_R[3.6_{13}r]$。左手的α-螺旋则为$3.6_{13}l$。

$3.6_{13}r$螺旋是最稳定的构象，因此它们在球蛋白中也是含量最丰富的。它在Ramachandran 图中位于中央，($\phi=-65°$，

$\psi = -41°$)，近来Matthews等（1974）在嗜热菌蛋白中发现存在一个左手的α-螺旋，由第226—229残基形成，此段螺旋的顺序为-Asp-Asn-Gly-Gly-，其φψ值为64°及42°。α-螺旋的半径为2.3Å。

2.3_{10}螺旋(3_{10} helix)，亦称γ螺旋

这种螺旋每旋转一圈需要3个氨基酸残基，靠氢键所形成的环由10个原子组成，故名为3_{10}螺旋，它的半径为2.0Å。

在蛋白质中3_{10}螺旋是比较稀少的，在球蛋白中有时仅存在一小段的3_{10}螺旋，通常存在于α-螺旋末端的一个旋转中（图3·9）。

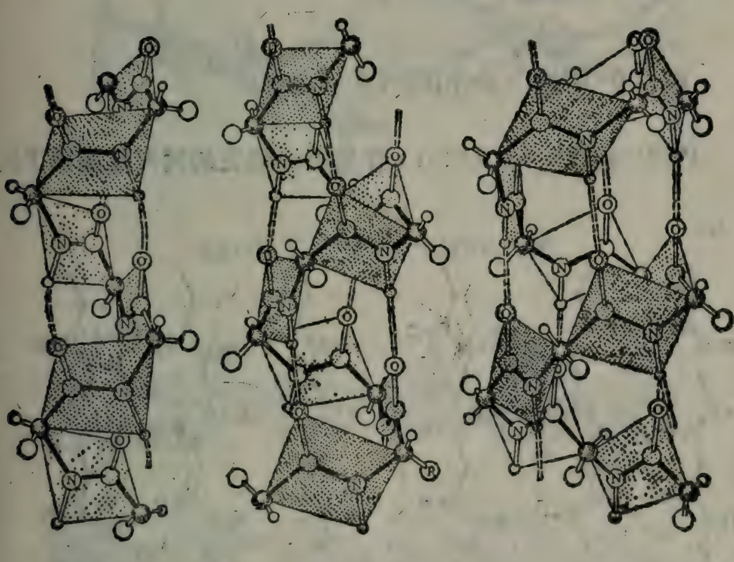


图3.9 α-螺旋，α_{10}螺旋及π-螺旋的结构

3.π螺旋(π-helix)

π螺旋每旋转一圈需要4.3个氨基酸残基，每个残基沿螺旋上升1.1Å，螺旋的半径为2.8Å，靠氢键形成的环由16个原子组成，故可写成$4\cdot3_{16}$螺旋。这种螺旋目前已在一些蛋白质中发现。

此外还有δ螺旋，它和π螺旋相似，为4.3_{14}l螺旋，是左手螺旋。

多聚脯氨酸（polyproline）具有典型的α-螺旋构象。现在发现在4种蛋白质中存在接近多聚脯氨酸的构象，如胰蛋白酶抑制剂的7—9残基，Gln-Pro-Pro。在细胞色素C_{551}中的Ile-Pro-Met-Pro-Pro-。它们在φψ图中分别位于−69°，150°及−78°，140°的位置。

四、β-折迭（β-pleated sheet）

Pauling及Covey（1951）在提出α-螺旋的同时还提出了β-

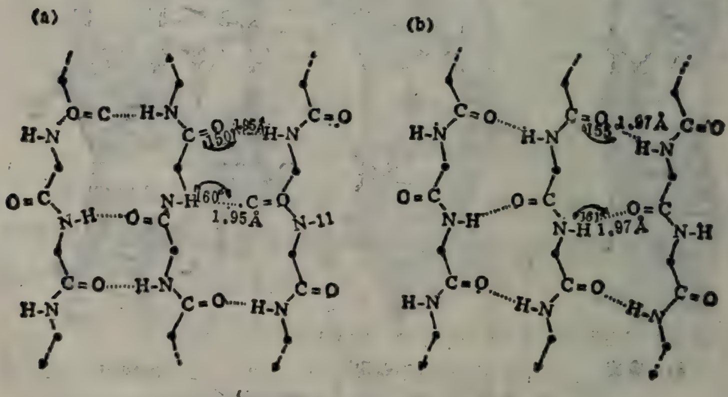


图3·10 β-折迭片的结构
（a）反平行（b）平行

折迭作为多肽链的一种结构。β-折迭是伸展的多肽链靠氢键联结的一种片状结构（图3·10）。

β-折迭片有两种：一种是平行β-折迭片(parallel β-pleated sheet)，肽链的方向是从 N-末端到 C-末端；另一种是反平行β-折迭片（antiparallel β-sheet)，一条肽链的方向是从N-末端到C-末端，另一条是从C-末端到N-末端，二者方向相反。

在β-折迭片中肽链的侧链(R)交替地朝上或朝下(图3·11)。

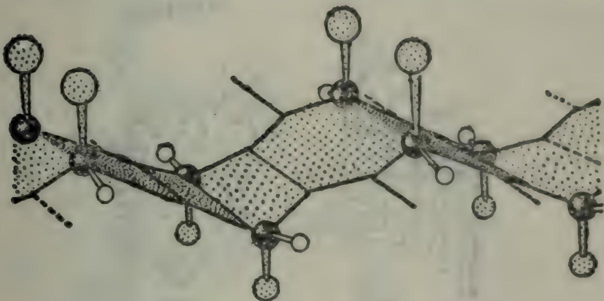


图3·11 β-折迭片中侧键R的位置

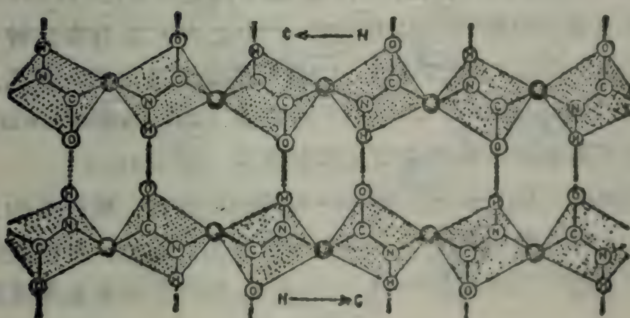


图3·12 β-折迭的肽平面图(反平行)

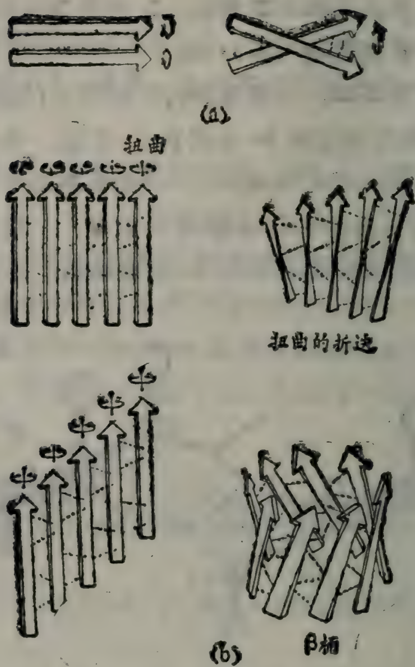


图3·13 β-折迭的扭曲

Pauling和 Covey 提出的β-折迭结构是平面的（Planar），在谷胱甘肽还原酶（Glutathione reductase）中存在这种平面的反平行β-折迭片(图3·12)。但是大多数球蛋白中β-折迭是非平面的（nonplanar），具有左手的扭曲（lcft-handed twist），使之能够围绕着α-螺旋紧紧地组装起来（图3·13）。

扭曲的六股β-折迭适合DNA双螺旋的深沟，而扭曲的二股反平行β-折迭则适合DNA 或 RNA 的浅沟。因此，扭曲的β-折迭结构可能在蛋白质与DNA（或RNA）相互作用中起着重要作用。

β-折迭结构在蛋白质结构中占有重要位置，例如，在丝蛋

白（fibroin）中存在β-折迭结构，在伸展的头发中也存在β-折迭。在球蛋白中大约存在15%的β-折迭结构（有些蛋白质主要由β-折迭组成）。β-折迭的平均长度大约为6个氨基酸残基（长约20Å），大约与蛋白质的结构域（domain）的直径相等。

五、回折（reverse turn）

在蛋白质分子中不同的二级结构如α-螺旋或β-折迭通常由

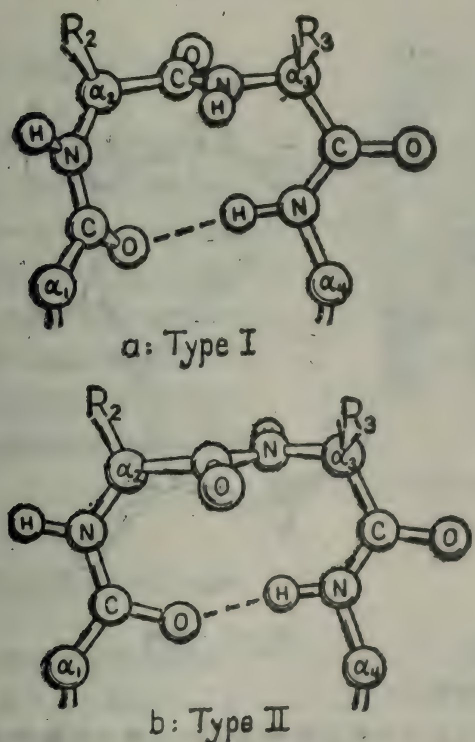


图3·14 β-转角的结构

一些转弯 180°的结构连接起来，这些结构称为回折（reverse turn）(图3·14)。

在球蛋白中回折是非常之多的，可以占到氨基酸总残基数的四分之一，Crawford 甚至指出球蛋白的氨基酸残基的三分之一都处于回折之中。

大多数回折存在于蛋白质的表面，它们大多数由亲水的氨基酸残基组成，使肽链在此处发生转折。在球蛋白中通常有两种回折，即β-转角（β-turn）和γ-转角（γ-turn）。

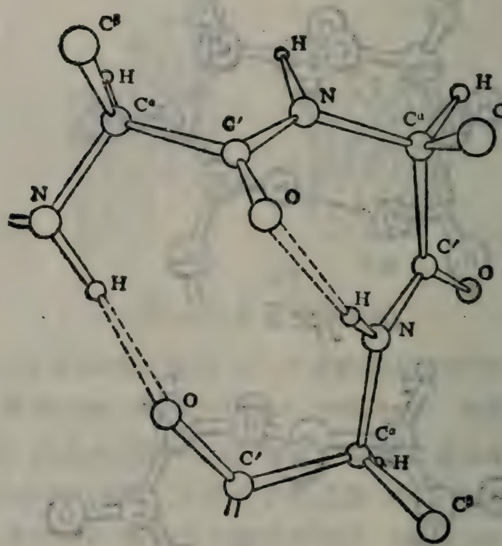


图3·15　γ转角

1.β-转角

β-转角由 4 个氨基酸残基组成，由 3 个肽键连接起来，第一个残基的C＝O与第四个残基的酰胺基之间形成氢键。β-转

角有I型和II型两种（图3·14）。

2.γ转角

另一种肽链的回折是γ转角（图3·15），在同一条肽链上发生。肽链转折方向不是在 4 个残基上而是在 3 个残基上发生。Printz等(1972）描述了这种γ转角，这种结构能连接两条反平行的β-结构，它只需要3个氨基酸残基，靠两个氢键使之稳定。Matthews（1972）研究嗜热菌蛋白（fhermolysin)的晶体结构时报道了这种转角，它包括嗜热菌蛋白的25—27残基。

六、β-突起(β-bulge)

在蛋白质的二级结构中，还有一种情况，在反平行的β-折迭中，有时在一条β-折迭片中插入一个额外的氨基酸残基，这样就形成了一个突起，Richardson 称为β-突起（β-bulge),好象在一个桶状物的腰部旋转了90°的方向。图3·16中用圆圈绘出的部分就表明β-突起。

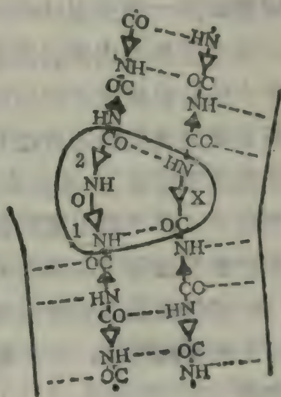


图3·16　β-突起的示意图

七、胶原螺旋(collagen helix)

动物结缔组织的胶原蛋白（collagen)是一种三螺旋（triple helix)，也是一种二级结构（图3·17)。胶原是由三股平行而伸展的左手螺旋拧成的超螺旋，形成胶原的单链为左手螺旋，由三股左手螺旋平行排列拧成一右手螺旋，它是一个螺旋的螺旋。

在$\phi\psi$图上它位于（-60°，+140°）。胶原螺旋肽链的绝大部分（96%）遵守（Gly-X-Y)$_m$的公式，X常含有脯氨酸(Pro)，Y常含有羟脯氨酸（Hyp)，Pro及Hyp含量各占11%。此三股螺旋靠Van Der Waals力及氢键结合在一起。在胶原中每3个残基即有一个甘氨酸（Gly)，使之稳定。因为Gly分子上没有侧链，故在轴上也没有侧链，于是形成一个紧实的螺旋结构。在外观上，胶原在X、Y位置上有侧链，沿着中轴Pro及Hyp的侧链形成螺旋的一些突起(helical bulges)。

由于胶原是由伸展的多肽链组成，因此，沿着中轴它能经受住很强的机械张力，此力与多肽链的骨架的共价键相平行，这很适合于在肌腱中传送力，或在皮肤中起保护作用。胶原是自然界中最丰富的蛋白质之一，许多脊椎动物的胶原是由2股α_1链及1股α_2链组成，α_1链的氨基酸顺序已经测定出来，含有1032个氨基酸残基，并且遵守（Gly-X-Y)$_m$的公式。

目前在球蛋白中尚未发现类似胶原的结构，但是在人的补体系统中，补体C_{1q}很可能存在这种结构，如果它与抗原结合，它可以识别抗体。

综上所述，蛋白质中存在的各种二级结构可以列成表3·2。

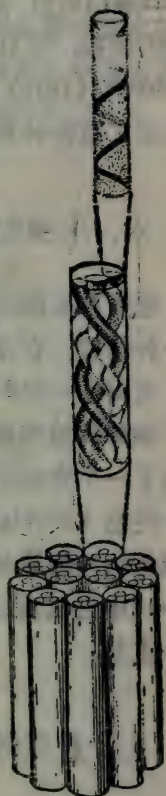


图3·17 胶原的结构

表3·2　　　多肽链所形成的二级结构

二级结构	实际观察	每转的残基数 (n) 及手性	每残基上升 (d) Å	螺旋的半径 (r) Å
平面平行β-折叠	稀少	±2.0	3.2	1.1
平面反平行β-折叠	稀少	±2.0	3.4	0.9
扭曲的平行或反平行β-折迭	大量	-2.3	3.3	1.0
3_{10}—螺旋	小段	+3.0	2.0	1.9
α—螺旋（右手）	大量	+3.6	1.5	2.3
α_L—螺旋(左手)	稀少	-3.6	1.5	2.3
π—螺旋	稀少	+4.3	1.1	2.8
胶原螺旋	纤维中	-3.3	2.9	1.6

注：+：右手，-：左手。

八、纤维蛋白与二级结构

蛋白质可以分为三大类：(1)纤维蛋白(fibrous proteins)；(2)球蛋白 (globular proteins)及 (3) 膜蛋白(membrane proteins)。纤维蛋白是蛋白质的空间结构研究得最早的一种，早在1931年结晶学家 Astbury 就开创了用X-射线衍射技术研究纤维蛋白结构的途径。

纤维蛋白的空间结构比较简单，主要由二级结构组成。纤维蛋白由氨基酸聚合成蛋白质的方式有两种：或者是伸展的多肽链（即β-折迭），或者是α-螺旋的多肽链，它们可以彼此缠绕在一起形成纤维蛋白。此外球状的蛋白亚基也可以螺旋状聚合成纤维状结构，例如F-肌动蛋白(F-actin)，原肌球蛋白(tropomyosin) 等，这种结构我们将在第九章详细讨论。本节只讨论第一类，它们主要是以正常的二级结构(即α-螺旋或β-折迭)组成的纤维蛋白。这类纤维蛋白又包含三小类：(1) 角蛋白；

(2)丝蛋白;(3)胶原。

1.角蛋白

纤维蛋白中最多样化的就是角蛋白(keratin),它们是动物的结构蛋白(structural proteins),如毛发、羊毛、角、羽毛、指甲、爪、鸟嘴、鳞片等的主要成分,具有坚韧的性质。角蛋白最广泛存在的形式是由α-螺旋构成的α-角蛋白(α-keratin),而在鸟类羽毛中的角蛋白则是由堆在一起的β-折迭片组成的β-角蛋白(β-keratin)。图3·18是头发中存在的典型的α-角蛋白中α-螺旋的排列方式,它们是由特别长的α-螺旋的多肽链组成的,彼此靠在一起形成长的绳索。α-角蛋白中的α-螺旋按照螺旋状拧在一起使绳索最终具有左手的螺旋。α-螺旋上的侧链也以螺旋方式排列,结果是侧链都排列在螺旋的同一侧,但是通常并不与螺旋平行。如果将毛发在热水或稀碱液中处理,α-角蛋白的长度可以伸长20—30%,这时α-螺旋即变成β-折迭,可以从X-射线衍射图证明,并且这个过程是可逆的。

α-角蛋白的一个重要特点是它们都不溶于水,如毛发、羊毛、角等都不溶于水,这是它们与球蛋白的最大区别。α-角蛋白富含不溶于水的疏水氨基酸,如丙氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸及甲硫氨酸等,并且在角蛋白的多肽链上氨基酸的R基团都位于绳索状螺旋的外周,因此使之更不溶于水。

2.丝蛋白

丝蛋白(fibroin)是组成蚕丝的蛋白质,蜘蛛网也是由丝蛋白构成的,它们也具有坚韧和不溶于水的特点。X-射线衍射分析表明,丝蛋白属于β-角蛋白,具有β-构象(β-conformation)(图3·18)。

蚕丝的丝蛋白的分子量很大,为350,000—415,000道尔顿,为反平行的β-折迭片。它含有50个重复单位,每个重复单位中

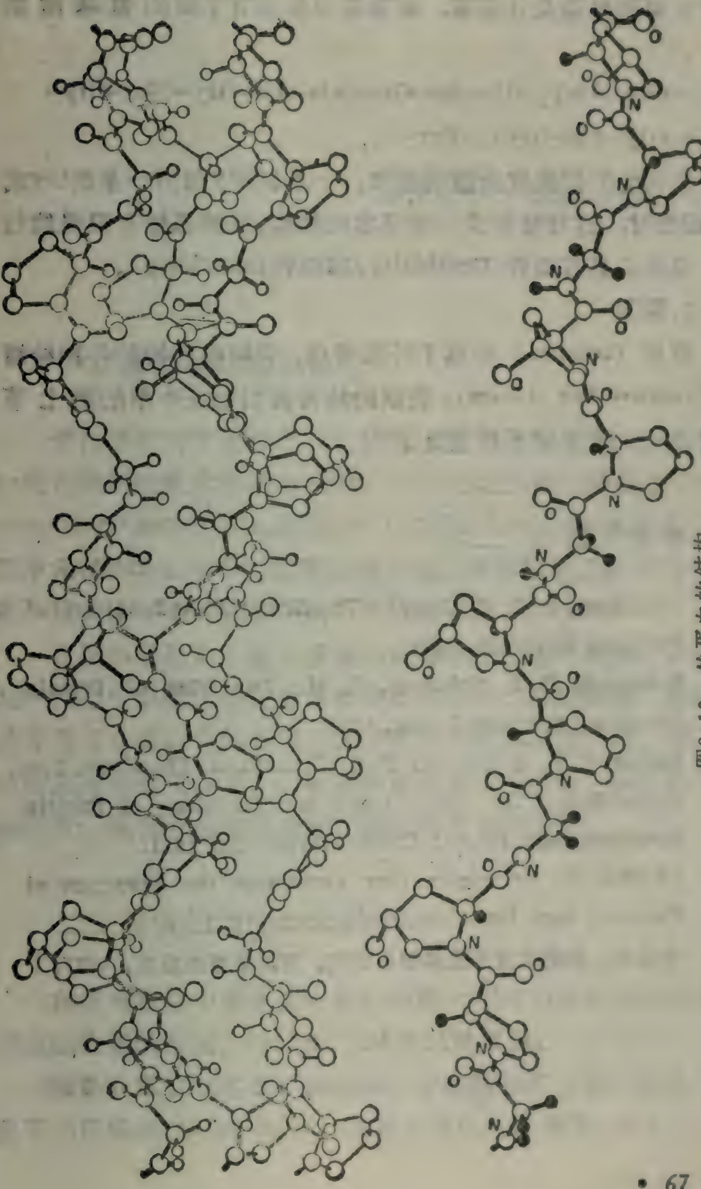


图3·18 丝蛋白的结构

含有大量丙氨酸及甘氨酸，其重复单位具有下面的氨基酸顺序：

-(Gly-Ala)$_2$-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Gly-(Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-Gly)$_8$-Tyr-

两条相邻的β-折迭彼此缠绕起来，一条以Gly与另一条的Ser或Ala相配对，这样就形成一条坚实的结构。蚕丝虽然有很强的拉力，但是又具有柔性(flexibility)和弹性(elasticity)。

3.胶原

胶原（colagen）也属于纤维蛋白，它构成动物的各种结缔组织(conrective tissues)，胶原的结构我们已在本章的第七节中讨论过，这里就不再重复了。

参考文献

1. Dickerson, R. E. & Geis, I.: The Structure and Action of Proteins, Benjamin, 1969.
2. Schulz, G. E. & Schirmer, R. H.: Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1979.
3. Cantor, C. R. & Schimel, P. R.:Biophysical Chemistry, 1980.
4. Richardson, J. S.: The anatomy and Taxonomy of Protein Structure, Adv. Protein Chem. 34:167—339, 1981.
5. Chothia, C.: Principles that Determine the Structure of Proteins, Ann. Rev. Biochem. 53:537—72, 1984.
6. 李家瑶：生物大分子晶体结构研究，四川教育出版社，1987。

第四章 超二级结构

一、超二级结构的概念

蛋白质结构中不但有二级结构，而且这些二级结构还形成一些有规则的聚合物，Rossman(1973)称之为超二级结构(super-secondary stracture)。后来Levitt与Chothia(1976)称它们为折迭单元(folding unit)。在蛋白质中超二级结构比二级结构在更高一级的水平上代表蛋白质中折迭的单位。

在蛋白质结构中超二级结构是经常存在的。例如，α-螺旋与β-折迭可以组成各种有规则的折迭单元，这说明超二级结构是非常适合多肽链的折迭，从而可以形成球状蛋白质。超二级结构的研究历史还不久，积累的资料也还不够多，尚有待不断的研究。现在已经知道的超二级结构有下列五种。

二、卷曲的卷曲α-螺旋

在纤维蛋白中卷曲的卷曲α-螺旋(coiled coil α-helix)是最常见的规则的形式。1953年Crick就已经提出。

两条α-螺旋（右手）彼此沿一个轴缠绕在一起，形成一个左手的超螺旋(super-helix)，其重复单位的距离为140Å。

这种卷曲的卷曲α-螺旋存在于α-角蛋白(keratin)、原肌球蛋白(tropomyosin)、副肌球蛋白(paramyosin)，及轻酶解肌球蛋白(light meromyosin)中。近来在球蛋白中也观察到小段的卷曲的卷曲α-螺旋，其中的α-螺旋以平行或反平行式紧紧地排列在球蛋白之中，如蚯蚓血红蛋白(hemerythrin)，烟草花叶病毒衣壳蛋白(TMV coat protein)，细菌视紫红蛋白(bacteriorbodopsin)等。此外还有细胞色素b_{562}(cytochrome b_{562})，南方菜豆花叶病毒(SBMV)也含有α-螺旋卷曲的卷曲（图4·1)。

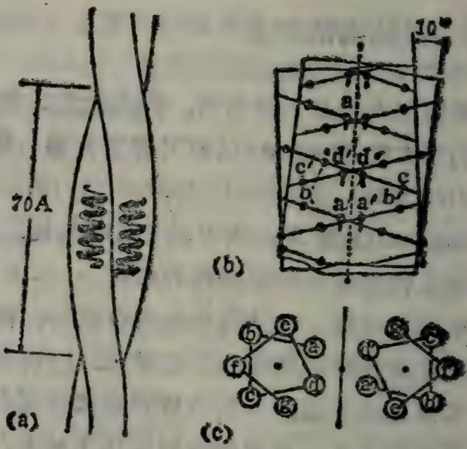


图4·1　卷曲的卷曲α-螺旋

(a) 左手螺旋的总图　(b) 为 (c)图的柱状图

(c)一对平行的卷曲的卷曲α—螺旋的横切面

三、βξβ单元

在多肽链中两股平行的β-折迭结构中间以ξ连接起来，称为βξβ单元 (βξβ unit)(ξ = ksai)。βξβ单元通常都是右手的，也称为β×β单元。

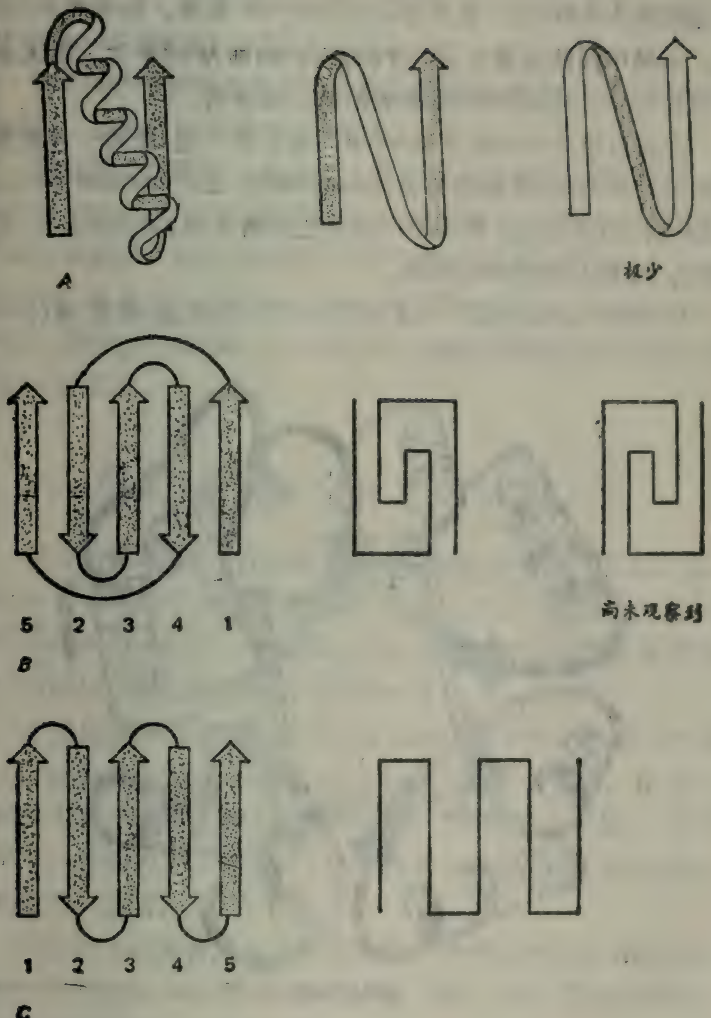


图4·2 超二级结构

(a)βαβ单元 (b)希腊钥匙花边 (c)β—迂回

在βξβ单元中，如果中间的连接为不规则的卷曲（coil），此单元即称为βcβ单元。如果中间的连接为α-螺旋，即称为βαβ单元。如果中间的连接为另一个β-结构，则称为βββ单元。在大多数球蛋白中已经观察到βξβ单元的超二级结构。

在蛋白质中时常有两组βαβ单元组合在一起，成为一种更复杂的超二级结构，这种结构称为Rossman折迭(Rossman fold)，它是βξβ的特殊形式。Rossman折迭包括两个相邻的βαβ单元，即βαβαβ，如图4·2中的(b)所示。

Rossman折迭存在于许多种蛋白质中，如乳酸脱氢酶(LD-



丙酮酸激酶

图4·3　丙酮酸激酶的三维结构
示其中的Rossman折迭

H)、苹果酸脱氢酶(MDH)、醇脱氢酶(ADH)、枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin)等，丙酮酸激酶(Pyruvate kinase)都是具有典型的Rossman折迭的超二级结构（图4·3)。

Rossman折迭除去具有βαβαβ的结构外，有时还具有ββααββ的结构，如乳酸脱氢酶的结构域2。

蛋白质中在顺序上邻近的二级结构，它们在三维结构中也常常相接触，这种情况常见的除βαβ外还有αα，即两个反平行的α–螺旋装配在一起；或ββ两个反平行的β–折迭装配在一起，这些结构也属于超二级结构。据Levitt和Chothia(1976)统计，31种蛋白质的超二级结构（αα,ββ,βαβ)的数量达到二级结构总片段的三分之二。

四、β–迂回(β–meanter)

在许多蛋白质中β折迭层由3个相邻的反平行β–折迭形成，它们中间以短链连接，这种结构Schulz（1980）称之为β–迂回(β–meander)。例如T_4–溶菌酶（T4–lysozyme)、葡萄球菌核酸酶以及LDH的催化部位都含有β–迂回。

在蛋白质结构中β–迂回是很常见的，在3条反平行β–折迭中，β–迂回占一半以上，因此，它们也属于超二级结构。在蛋白质结构中β–迂回可以和α–螺旋相比拟。据Richardson统计，在许多种蛋白质结构中，如果有3个β–折迭相连接存在，那么最常见的就是β–迂回。

β–迂回又有多种，包括希腊钥匙(Greek key)，双希腊钥匙(double Greek key)等多种，图4·4，图4·5举出了蛋白质中含有这种结构的例子，以见一斑。

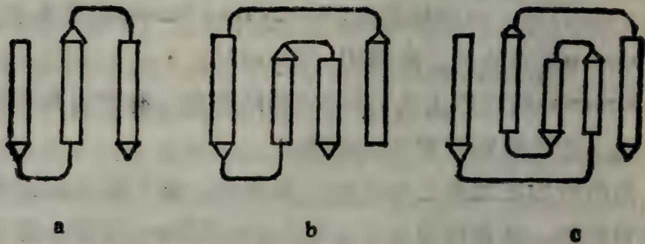


图4·4 (a) β-迂回；(b)希腊钥匙；(c)双希腊钥匙

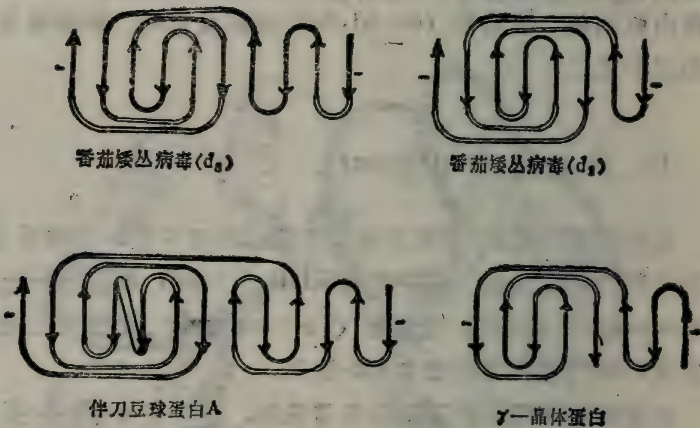


图4·5 各种蛋白质中的希腊钥匙图

五、β-折迭桶 (β-barrel)

在蛋白质中β-折迭片可以进一步折迭成桶状的结构，Richardson(1982) 称之为β-折迭桶(β-sheet barrel)，简称β-桶(β-barrel)。

β-折迭桶由β-折迭片形成，长的反平行的β-折迭片全部地

或部分地卷成一个桶状。组成β-折迭桶的折迭片少的时候可以是 5 个，多的时候可以达到15个β-折迭片。它们的中心由疏水的氨基酸侧链形成，葡萄球菌核酸酶(staphylococcus nuclease)的β-桶由 5 股β-折迭组成，大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean try-

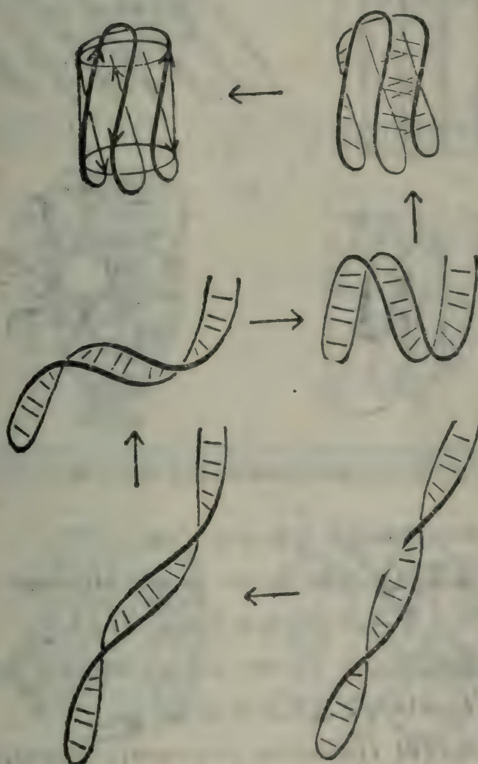


图4·6 β-折迭桶形成的过程示意图

(β-桶为希腊钥匙式样)

psin inhibitor）含有6个，免疫球蛋白（IgG）的恒定区含有7个，超氧化物歧化酶(superoxide dismutase）含有8个β-结构。图4·6，4·7是由β-折迭片形成β-折迭桶的过程的简明示意图。

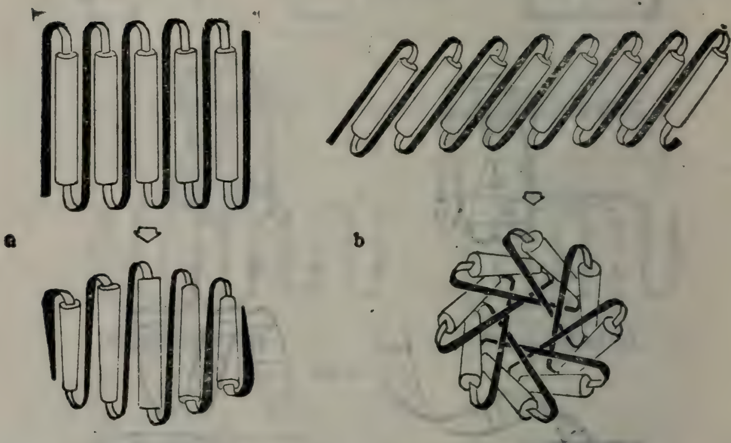


图4·7　由Rossman折迭形成的β-桶

Richardson将β-桶的结构分为三类：

(1) 印地安花篮结构(Indian basket structure)，如木瓜蛋白酶（papain)，大豆胰蛋白酶抑制剂；

(2) 希腊钥匙结构（Greek key structure)，如胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin)，超氧化物歧化酶；

(3) 闪电结构（lightning structure)，如磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase)。

β-折迭桶的形成过程可以图4·8表示，这样形成的结构是希腊钥匙结构。

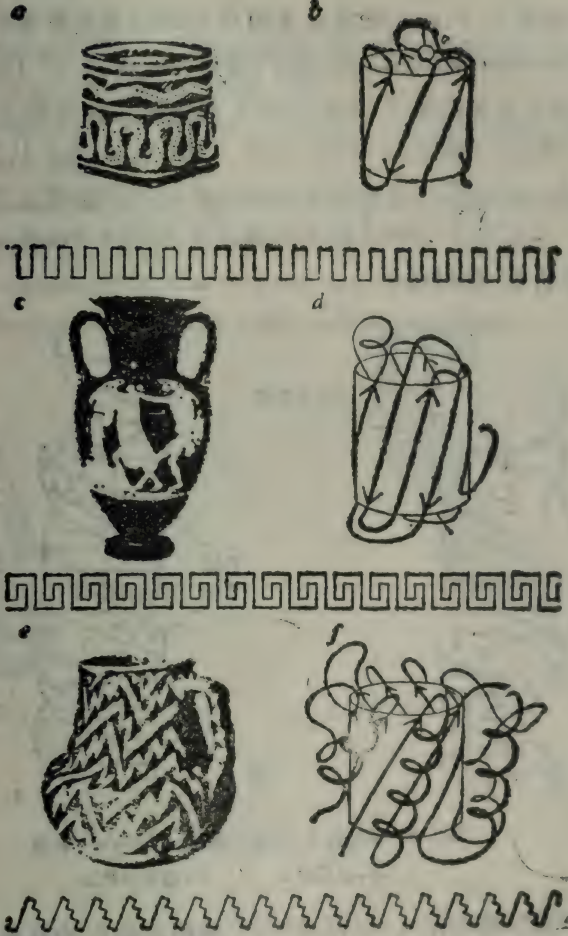


图4·8 美国印地安及希腊陶器上的花边与β迂回、希腊钥匙及闪电结构的比较（Richardson）

六、α-螺旋—转角-α-螺旋

Sauer等人（1982)在研究蛋白质与DNA相互作用时发现噬菌体λ(Bacteriophage λ)，434或P22的λ阻遏蛋白（λ repressor)与DNA分子上的操纵子（operator）结合部位的结构都是一种α-螺旋-转角-α-螺旋(α-helix-turn-α-helix)，他们认为这也是一种超二级结构。这种结构在蛋白质与DNA的结合中占有重要地位，它可能是与DNA结合的蛋白质（DNA-binding protein）的共同特征（图4·9）

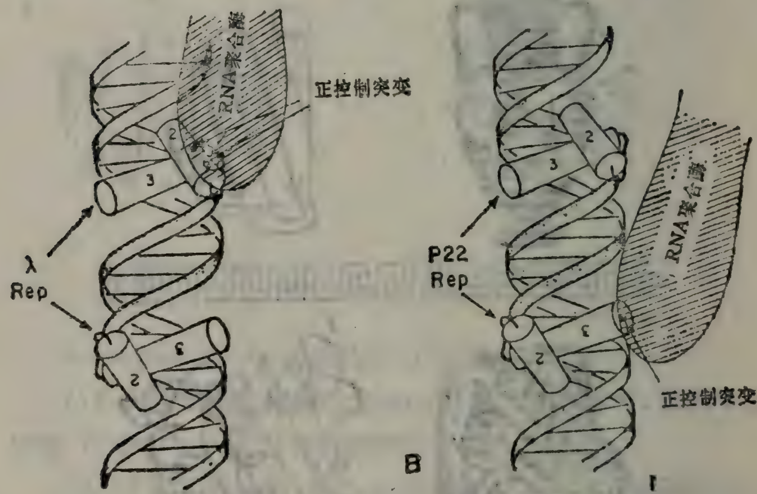


图4·9 α螺旋—转角-α螺旋与DNA的结合

A.噬菌体λ B.噬菌体P22

据测定噬菌体λ，434以及P22上的阻遏蛋白的氨基酸顺序都相同，特别是在具有α-螺旋—转角-α—螺旋的超二级结构的部位的氨基酸顺序完全相同，这种结构可能是许多种与DNA结合

的蛋白质的共同特点。

参考文献

1. Schulz, G. E. & Schirmer, R. H.: Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1969.
2. Creighton, T. E.: Proteins Structure and Molecular Principles, 1983.
3. Rossman, M. G. & Argos, P.: Protein Folding Ann. Rev. Biochem, 50:497—532, 1981.
4. Richardson, J. S.: The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, Adv. Protein Chem, 34:167—339, 1981.

第五章　结构域

一、引言

生物化学家很早已经认识到在蛋白质分子中存在着球状的亚结构。Phillips(1966)在研究鸡卵溶菌酶(Lysozyme)的X-射线衍射分析以及Drenth等(1968)研究木瓜蛋白酶(Papain)的晶体结构时都注意到在这两种单肽链的酶中存在有被一个裂口分隔开的球状单元，在裂口上溶菌酶的底物多糖或木瓜蛋白酶的底物肽与之结合。在此之前Porter(1959)就发现免疫球蛋白的轻链和重链是由可以分离的单位组成的。目前已在大量球蛋白、酶及结构蛋白如肌球蛋白中发现了类似的结构。Wetlaufer(1973)将蛋白质中的这种亚结构称为结构域（structural domains 或 domains)，认为蛋白质三维结构中存在的这些易于鉴别的球状亚结构具有重要的功能。

大多数大蛋白质分子都分裂成几个结构域，每个结构域含有100～150个氨基酸残基，大致相当于直径为25Å的小球(globules)。图5·1为胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)的两个结构域，氨基酸残基1—122为一个结构域，残基123—245为第二个结构域。这可能是由于一个大的蛋白分子分隔成几个结构域，可以使折迭过程变得简单得多，使每个独立折迭的单位的长度变得更小

些。现在由编码蛋白质的基因的核苷酸顺序已经了解到，每个结构域是由与之相对应的外显子(exon)编码而成的。

结构域是多肽链的一个小区(subregion)。在蛋白质分子的电子密度图中可以看到彼此被分隔成不同的区域的部分。当进行蛋白质的X-射线衍射并计算电子密度图的过程中往往可以观察到，在许多种蛋白质分子中含有彼此连接松散的球状部分，这些球状部分从电子密度图中就可以看出它们的轮廓来。这些部分就是结构域。结构域是蛋白质分子在空间上分隔的部分，蛋白质分子好象是两个或多个裂片所组成的。

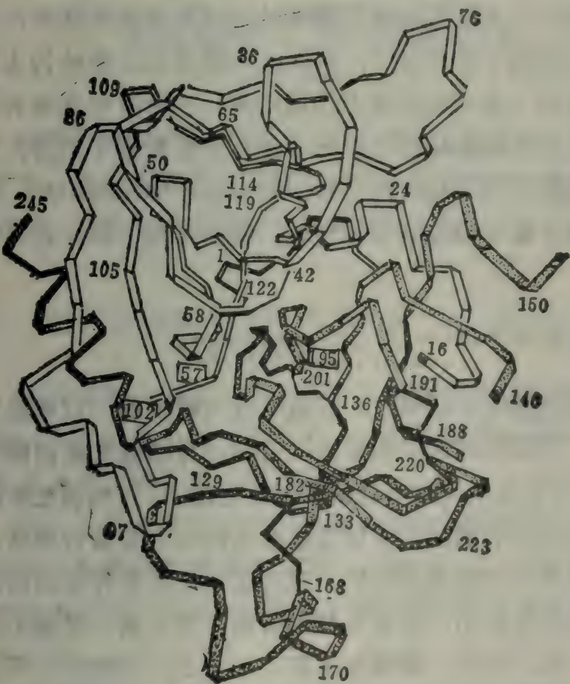


图5·1 胰凝乳蛋白酶的两个结构域
（带点的为一个结构域，无点的为另一结构域）

结构域的概念现在已为生物化学家所普遍接受，在描述蛋白质结构时都已使用结构域这个名词。

一个蛋白质分子的不同结构域可能含有完全不同的结构。例如，一个结构域中含有4个α-螺旋结构，而另一个结构域则由反平行的β-折迭形成的β—折迭桶组成。

二、邻近相关性

在蛋白质分子中多肽链并不是随意折迭的，肽链的折迭有一定的规律。在多肽链上彼此邻近的氨基酸残基在球蛋白的三维结构上也倾向于彼此邻近，而远离的残基在三维结构上也倾向于彼此远离（处于几何学上的远距离）。在所有可观察到的含有两个以上结构域的球蛋白分子中都可以看到这个原则，结构域表现出高度的邻近相关性（neighborhood correlation）。

邻近相关图可以显示出结构域，我们可用下式计算邻近相关数。

$$\text{邻近相关}(i)=\sum_{6<|i-k|<25}\frac{1}{\text{距离}(i,k)}。$$

邻近相关是残基数目的函数，以残基数为横坐标，以邻近相关为纵坐标，可以得到邻近相关图。 图5·2为胰凝乳蛋白酶的邻近相关图，图中显示出两个峰由中间的谷隔开，这表明在多肽链中有两个区域在折迭过程中将残基在几何学上安排得很靠近。它们在多肽链上也是很靠近的，这些区域应当看作是结构域。

邻近相关性表明一条多肽链的折迭行为好象一条绳子，手持绳子的一端，让另一端慢慢地落在地面上，在地面上所形成的绳子的折迭不是随意的，而是表现出邻近的部分折迭在一起，离开远的部分彼此远离，绳子不是纠缠在一起，而是提起绳子

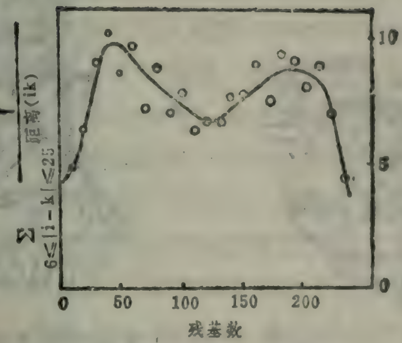


图5·2 多肽链的邻近相关图
胰凝乳蛋白酶的邻近相关数为残基i的函数

的一端很容易散开。根据这个原则，肽链不应当存在打结(knot)的结构。事实上在所有已知结构的蛋白质分子中都不存在打结的结构，这也可以证明邻近相关性的原则。

三、结构域的一般性质

在蛋白质中许多二级结构单位结合形成结构域，其性质一方面由多肽链的手性决定，另一方面也由于组装需要将蛋白分子的疏水表面积尽量减到最小而决定。

在一个蛋白质分子中结构域有时彼此的结构很不相同，如木瓜蛋白酶的结构域1和结构域2（图5·3），但有些则很相似，如弹性蛋白酶（elastase)的两个结构域都具有β-折迭桶的结构（图5·4）。

结构域的大小变化很大，可以从40个残基到400个残基，但最常见的结构域大小范围在100～200个残基之间。

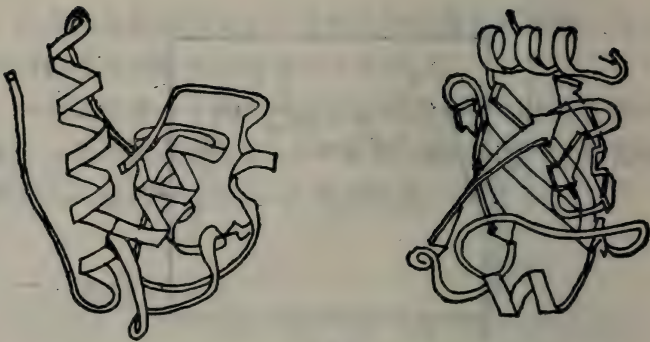


图5·3 木瓜蛋白酶（papain）的结构域1和结构域2

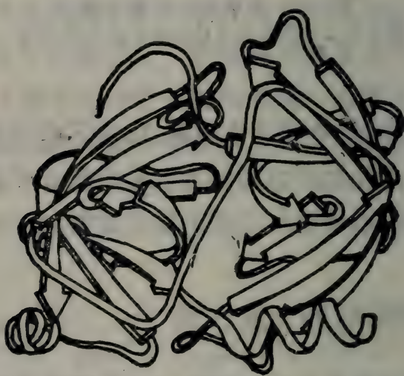


图5·4 弹性蛋白酶(elastase)的两个结构域，都具有β-桶的结构。

酶分子的活性中心（active center）常常存在于两个结构域的交界面上，使各个结构域的功能集合在一起，便于形成更特殊的分子，使之具有各种功能，如各种脱氢酶。

蛋白质分子中结构域的存在可能是蛋白质分子遗传发育的结果，也可能代表蛋白质折迭的基础。每个结构域可以有自己独立的折迭过程，而与其它结构域无关，最后的三级结构可能是这些折迭的总汇合。

真核生物的DNA中含有外显子(exon)和内含子(intron)，内含子是不编码蛋白质的插入顺序（intervening sequence)，大概一个外显子翻译成一个结构域。例如，肌动蛋白（actin）的三维结构已于1981年由Suck等人测定完成，其分子大小为67×40×37Å，由一个大结构域和一个小结构域组成。每个结构域含有类似的结构，中央为β-折迭片，外围为α-螺旋。最近Shah等（1983）测定了玉米和大豆的肌动蛋白的基因，此基因含有3个内含子和4个外显子，其中两个外显子很小，主要的两个，一个是中等的，一个是大的。可能是小的外显子不能形成结构域，而中等的和大的外显子形成一大一小的两个结构域，这与蛋白质晶体学的研究结果是一致的。

四、一些蛋白质的结构域举例

1.免疫球蛋白（immunoglobulin)

结构域的概念最早是由Edelman(1970)为了描述免疫球蛋白(Ig)而提出来的。早在1959年，Porter就用木瓜蛋白酶水解法将IgG的不同结构域分开了。以后Amzel（1979）等研究IgG的3-D结构时更进一步证实了IgG结构中存在结构域。IgG分子由12个结构域组成，4个位于两条轻链中，8个位于两条重链，结果如图5·5。

2.羧肽酶A（carboxypeptidase A）及嗜热菌蛋白(thermolysin)

羧肽酶A和嗜热菌蛋白的分子量都在34,000左右，它们都含有Z_n^{2+}，属于含Z_n蛋白，它们都需要Z_n^{2+}催化酶的活性。

嗜热菌蛋白由两个结构域组成，一个的顺序从1—157位残基，第2个从158—316位残基，二者明显分开。

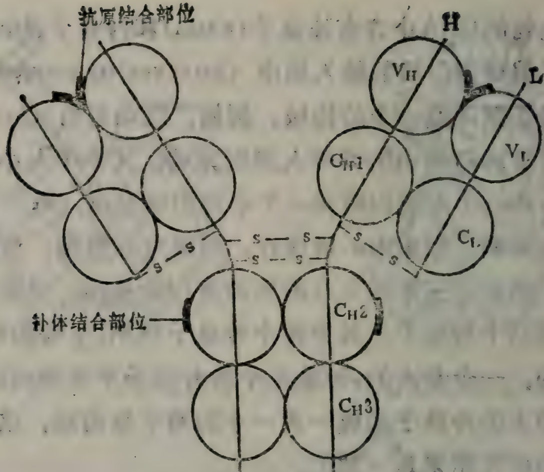


图5·5 免疫球蛋白的结构域

3.胰凝乳蛋白酶及弹性蛋白酶(elastase)

在胰凝乳蛋白酶中，第16—130氨基酸残基形成结构域1，第131—245残基形成结构域2(图5·1)。在弹性蛋白酶中，第16—125残基组成结构域1，第126—245残基组成结构域2。

在这些蛋白酶中，酶的催化活性是由两个结构域共同提供的，如*His*57、*Asp*102存在于结构域1中，而*Ser* 195则存在于结构域2中，底物的结合部位定位于结构域2，在二个结构域的小球之间存在一个裂隙(cleft)，能与底物相结合。

除此以外，木瓜蛋白酶、磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinaise)，枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin)，以及G-3-P脱氢酶 (GPDH)的分子中都存在明显的结构域。现在结构域已为蛋白质化学家普遍接受。

五、结构域的运动

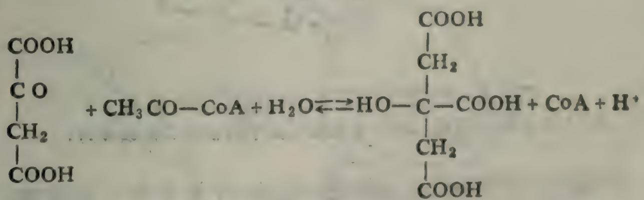
构象变化是酶作用机理的一个重要部分。蛋白质晶体测定

在不止一种情况下，已经证明个别氨基酸的侧链可以运动，线圈(Loop)可以重新折迭，以及免疫球蛋白结构域的铰链(hinge)可以运动。近年来经过高分辨率的结构分析，包括应用电子计算机图象分析技术，Chothia等人(1983,1984)已经鉴定出另一类构象变化，即装配紧密的α-螺旋空间配置的变化，他们证明当酶与底物结合时，在酶的结构域之间，裂隙的开启与关闭中螺旋的移动起着重要作用。

蛋白质内部是紧紧装配的，因此酶的作用机理要依赖二级结构之间的相互作用。在螺旋蛋白中，其内部通常是由α-螺旋组装形成的，α-螺旋贯穿分子的内部，而其外表面则由短的线圈连接起来。他们在研究柠檬酸合成酶(citrate synthetase)时，发现α-螺旋的骨架以刚体状态运动，装配的螺旋的相对位移可以达到1·5Å。

许多酶在与底物结合后发生构象的变化。在一般情况下，酶的活性部位位于两个结构域之间的裂缝中。构象变化就包括有结构域的运动，以便使之关闭覆盖在底物和辅基上。结构域的这种运动可以使催化基团定向地包围着底物，辨别出不合适的底物，并从活性部位上将水分子排除出去。

在三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle)中起关键作用的柠檬酸合成酶就是一个很好的例子，它能催化下列化学反应：



草酰乙酸　　乙酰辅酶A　　柠檬酸　　辅酶A

柠檬酸合成酶的三维结构已经由Remington等(1982)测定

完成。它是一个二聚体，而单体是由两个结构域组成的，一大一小，活性部位就存在于两个结构域的裂缝之中（图5·6）。组成单体的437个氨基酸残基折迭成20个α-螺旋，分别定名为A、B、C、D，以至T，并有一段小的双股β-折迭片。从A至M及从S至T的15个α-螺旋形成大结构域，其余5个结构域N至R，形成小结构域。在大小两个结构域之间有一个较大的界面，主要由大结构域的螺旋K及S与小结构域的P、R组成。

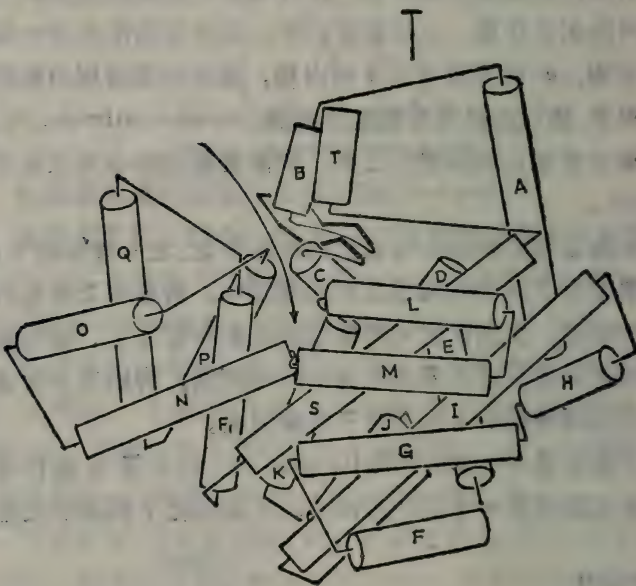


图5·6　柠檬酸合成酶中的结构域的关闭
（一个亚基的示意图，另一个亚基以图中的轴作二重轴排列）

柠檬酸合成酶要与底物络合成活性复合物，其结构必须是底物与柠檬酸合成酶先结合，然后再与辅酶A络合，把底物埋藏起来。已知酶分子可以两种状态与底物络合：一种状态是只

络合柠檬酸；另一种状态是柠檬酸与辅酶 A 都络合。比较这两种结构可以看出，在完全络合的状态下，两个结构域完全关闭起来，即柠檬酸与辅酶A完全被包埋在内。他们分析了有关这个酶结构域之间裂缝关闭的机理，结果如下。

(1)7个α-螺旋（FGHILM及S）不论关闭，或者开启时都具有相似的空间排列，它们构成这个结构域的半刚性核心。

(2)其余13个螺旋与这个核心进行相对的运动。

(3)位于核心与小结构域表面间的紧密螺旋彼此相互运动，每次运动的位移为0.2Å至1.8Å，旋转为4°至11°。

(4)螺旋的相对移动产生累积效应，因此，在小结构域的螺旋O相对于核心移动10.1Å及28°。

(5)螺旋移动的效果是螺旋O及P之间的线圈移动6.1Å及28°，于是它们覆盖在柠檬酸及辅酶A上，并在二者之间形成氢键。

其它酶作用时也发生结构域的运动。例如图5·7是马肝的醇脱氢酶（alcohol dehydrogenase）的二聚体酶分子的两个催化结构域(catalytic domains)的运动的示意图，箭头表示催化结构域的旋转。

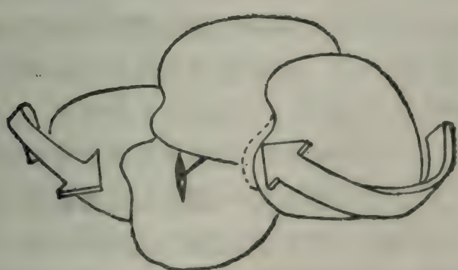


图5·7　醇脱氢酶的结构域的运动

目前蛋白质的动力学(dynamics)已经成为蛋白质化学或分子生物学的一个重要研究领域，它将对酶的作用机理、蛋白质的功能作出更深入、更进一步的解释，使我们对生命现象的理解更深入到分子水平。在第十一章中我们还将讨论血红蛋白的构象变化与氧的运转的关系，这也是蛋白质动力学的一个重要例证。

参考文献

1. Sehulz, G. E. & Schirmer, R. H.: Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, 1979.
2. Richardson, J. S.: The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, Adv. Protein Chem., 34:167—339, 1981.
3. Rossman, M. G. & Argos, P.: Protein Folding Ann. Rev. Biochem., 50:497—532, 1981.

第六章　三级结构

一、球蛋白的折迭原则

球蛋白（globular proteins），顾名思义，它们与纤维蛋白（fibrous proteins）不同，通常具有圆球的形状。不过，对球蛋白的三维结构的研究表明它们含有构成纤维蛋白特征的许多二级结构，以最早测出三维结构的球蛋白细胞色素C（cytochrome C）为例，这个由104个残基组成的蛋白质就含有α-螺旋、β-折迭片等二级结构，此外还含有β-转角和具有不规则构象的多肽链（图6·1）。

目前已有大约200种蛋白质被测定出了它们的三维结构，显示出球蛋白结构的一些规律。仔细比较它们的三级结构可以看出许多蛋白质具有相似的基本结构，蛋白质之间的共同结构特点说明这些特点有共同的物理原因，这些相似性反映两类不同的物理影响。其中第一个就是手性效应（chiral effect），即蛋白质中肽链的排列是有手性的（"handed"），分为左手和右手。这是由于多肽链是由手性的L-氨基酸所组成的。蛋白质三级结构的第二个重要效应是二级结构（如α-螺旋及β-折迭）为了最有效地组装在一起，将蛋白质亲溶剂的表面积减少到最小的程度。我们在下面讨论这些效应。

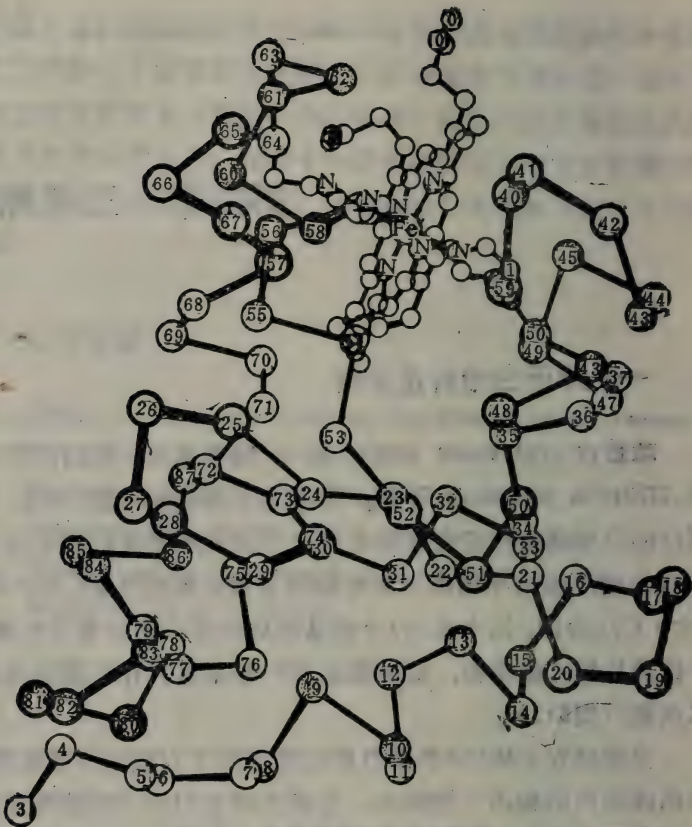


图6·1 细胞色素C的三维构象

α-螺旋：9—15，33—38，43—49，55—61，65—73，80—86

β-折迭：4—8 20—25，88—32；50—54，74—79

β-转角：17—29，25—28，39—42，49—52，64—67，80—83
α—β β—β α—α α—β α—α β—α

1.多肽链的手性对蛋白质折迭的影响

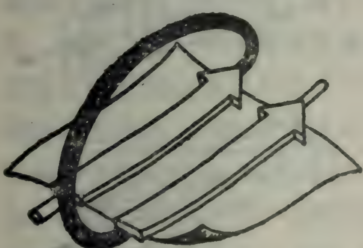
我们已讨论过由于立体化学的限制能存在的多肽链的构象是受到约束的。经常存在的结构为α-螺旋，显然表示这种结构

不只是允许的而且是特别稳定的。根据蛋白质主要由手性的L-氨基酸组成的事实，多肽链的最稳定的构象并不是直的，就不足为奇了。从蛋白质构象的能量计算，多肽链还是以稍微向右手扭曲为好（向下俯视多肽链的轴），多肽链转动位置180度，结果就使肽链在右手方向产生一个线圈（coil）。

在球蛋白中形成β-折迭片的肽链有两种，即平行的和反平行的。从一条β-折迭到另一条β-折迭，以同一端相连接的只存在于反平行β-折迭中（发夹状hairpin），而在平行β折迭中从一条到另一条之间则需要有一个交叉（crossover），或为右手或为左手（图6·2）。而实际上在蛋白结构中观察到的所有交叉



a



b



c

图6·2 (a) 反平行式β-结构，(b)、(c) 平行式β-结构

均为右手，不管它们所连接的β-折迭是否靠近。这可能是由于右手交叉在能力学上最为适宜所造成的。

伸展的多肽链发生扭曲以减少其构象的能量的第二个结果反映在球蛋白平行β-折迭的几何学上。我们观察到沿多肽链方向俯视时球蛋白的β-折迭片永远是朝右手方向扭曲。β-折迭的这种扭曲行为在蛋白质的结构上是一个重要性质，因为扭曲的β-折迭往往构成蛋白质结构的骨架。许多蛋白质如磷酸丙糖异构酶（triosephosphate isomerase），丙酮酸激酶（pyruvate kinase domain I），乳酸脱氢酶（LDH domain I），羧肽酶（carboxypeptidase），黄素氧还蛋白（flavodoxin），腺苷酸激酶（adenylate kinase)的肽链折迭中都参入了扭曲的β-折迭或混合的β-折迭片，这里面包括蛋白端解酶的羧肽酶A，传递电子的蛋白质黄素氧还蛋白及糖酵解酶的磷酸丙糖异构酶。虽然这些酶都有右手扭曲的β-折迭，但是很明显它们的几何学则不一样。羧肽酶和黄素氧还蛋白是平缓扭曲成马鞍状（saddle

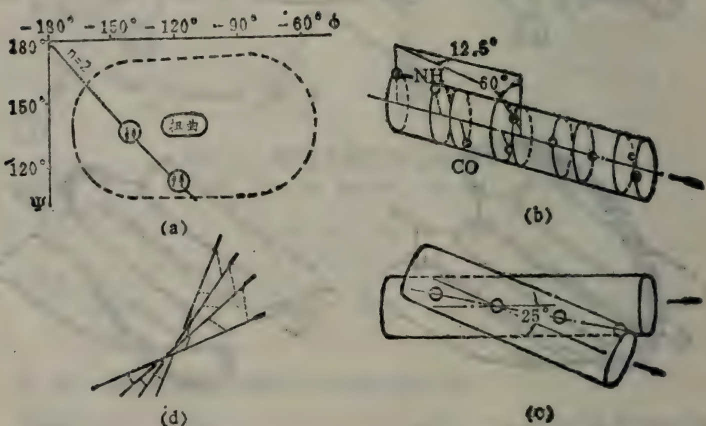


图6·3 β-折迭片的扭曲

shape)(图6·4)，而磷酸丙糖异构酶的β-折迭片则成β-桶状（图6·5）。



图6·4 黄素氧还蛋白的三维结构，其中的β-折迭片呈马鞍形

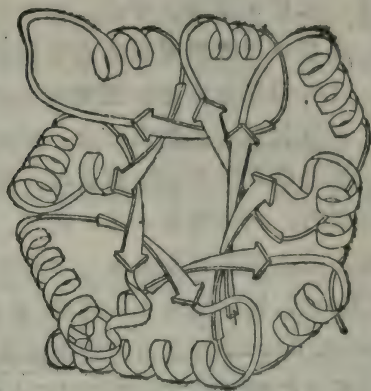


图6·5 磷酸己糖异构酶的三维结构，其中的β-折迭呈β-桶状

在平行β-折迭结构的每种类型中，氢键的样式可以从作用于多肽链内和链间的力来理解。在羧肽酶及LDH的近似长方形的折迭片的情况下，这个几何形状反映出个别链的扭曲与链间氢键的维持之间的竞争。当折迭片扭曲时链间的氢键倾向于拉直，因此，阻止将扭曲作用施加于折迭片上，马鞍形的几何形状就反映这些力通过折迭片的均匀分布（图6·3）。磷酸丙糖异构酶中形成桶状的β-折迭片与上述情况不同，它们形成一个具有桶状凹陷的沙漏（hourglass）状表面。具有摇晃的氢键的扭曲β-折迭自动地产生一个桶状凹陷，反之在桶状表面上的扭曲的折迭片上需要摇晃的氢键（stagged H bonds）。在上述两种情况下作用力是相似的，而最后结果反映出链的扭曲与链内氢键的保持之间的抵消。

手性既影响平行β-折迭的连接，也影响它的几何形状，按上述原则平行β-折迭之间的交叉连接都是右手的。在平行的β-桶中，连接不能深入中心，桶的中心大小足以适应容纳疏水侧链。多肽链骨架以简单的右手旋转围着β-桶缠绕起来，一次移动一个β-折迭片而把α-螺旋围在外面。因此，虽然这些结构较大，而其折迭方式则很简单，如磷酸丙糖异构酶。

在马鞍形的平行β-折迭中，如羧肽酶、硫氧还蛋白或黄素氧还蛋白，在每侧有一层α-螺旋。用右手交叉连接来完成这种结构，多肽链必须有时沿一个方向移动，有时沿另一个方向移动(图6·4)。这种花样有时称为"核苷酸结合结构域"(nueleotide binding domain)，因为这类蛋白质大多数结合一个单核苷酸，或二核苷酸辅基于其β-折迭的C末端。

在反平行β-蛋白中，手性原则也影响β-折迭围绕桶状结构的扭曲。最常见的结构是反平行β-折迭桶，其中β-折迭之间的连接横穿桶的顶部或底部，而不是直接连到它的最近邻的折迭片上。如果将桶展开，放平，并从溶剂一侧观看，则折迭片的连接将有如图6·6所示的形状，这称为" Greek Key "拓扑学(topology)，因为它很象希腊花瓶上常见的花边。

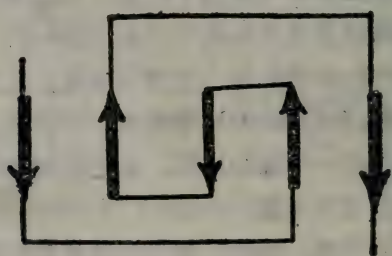


图6·6 "Greek Key" 拓扑学

2.二级结构之间的组装及结构域的形成

上节我们讨论了能量上优先的多肽链的手性在β-折迭片等的连接上以及球蛋白β-折迭片的整个几何形状表现出来，在蛋白质结构的形成中另一个重要因素是将二级结构组装在一起形成一个更大的单位。其中最常见的组装之一就是超二级结构βαβ，在两个靠氢键相连的平行β-折迭上紧紧连上一个α-螺旋，磷酸丙糖异构酶可以看作是一系列交叉的βαβ结构所组成的。整个结构可以看作是由β-折迭片组成的内部的桶，被α-螺旋组成的外部的桶紧紧包装起来。

反平行的β-折迭片形式的常见的蛋白质是有两层β-折迭片，如胰蛋白酶结构域I，番茄矮丛病毒（TBSV）结构域3，伴刀豆球蛋白A（concanavalin A）等。另一些反平行的β-蛋白只有一层扭曲的β-折迭片，而在其上面覆盖着一层α-螺旋或线圈，如磷酸甘油醛脱氢酶结构域2，细菌叶绿素蛋白（bacterio-chlorophyll protein）。

单层结构的蛋白质是不稳定的，因为蛋白质至少需要两层才能把疏水基团掩盖起来，故单层蛋白是不存在的。反平行β-蛋白是典型的双层结构，因为反平行折迭片有一侧暴露于溶剂中。平行β-折迭片至少还需要多一层，以便产生平行β-折迭片之间的交叉连结。与反平行β-蛋白不同，它们有一面不能耐受溶剂的暴露，它们总是在蛋白中心作为结构骨架，而在两侧有另外的结构。所以，这类蛋白通常有三层，如磷酸甘油醛激酶；或具有四层，如磷酸丙糖异构酶（图6·7）。

完全由α-螺旋作为二级结构的蛋白质也是靠螺旋之间紧紧装配的，有些球蛋白的基础是一组4个α-螺旋束。4个α-螺旋顺序连接到其最邻近的螺旋组装在一起具有一个近乎四方的横断面，因为每个螺旋彼此以18度角相互作用，整个螺旋具有左

手的扭曲。细胞色素C，细胞色素b_{562}，TMV外壳蛋白等都是这类蛋白质（图6·8）。

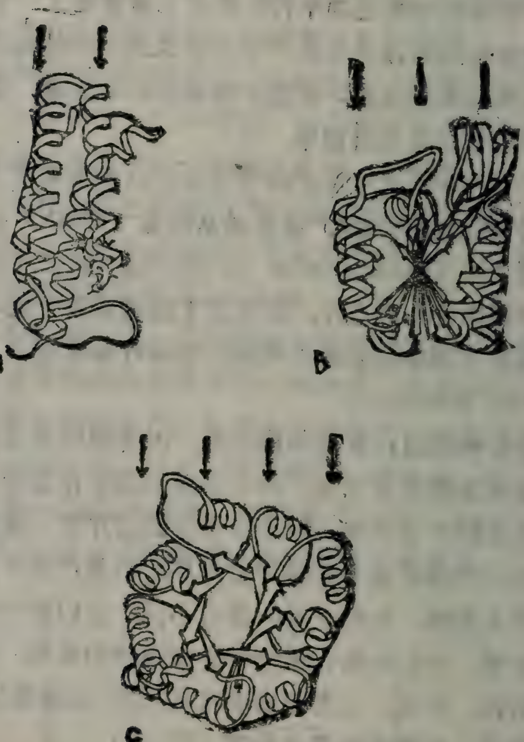
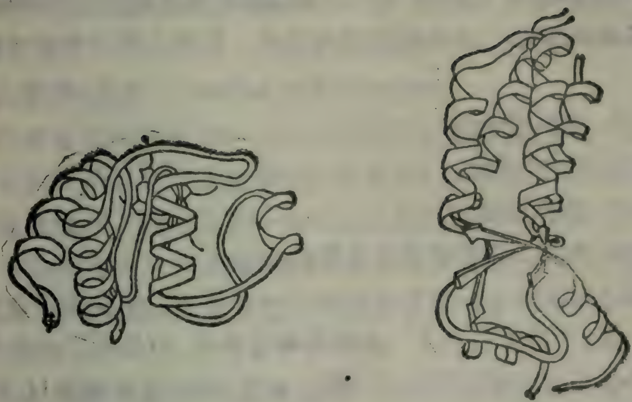


图6·7 具有不同层数的骨架结构的蛋白质结构域

(a)二层的细胞色素c′；(b)三层的磷酸甘油醛激酶结构域2；(c)四层的磷酸丙糖异构酶；箭头指骨架的层次。



(a)　　　　　　　　　　(b)

图6.8　(a) 细胞色素c，(b) TMV外壳蛋白

二、球蛋白的分类

蛋白质的分类学（taxonomy）应当是根据蛋白质的三级结构来划分蛋白质的种类，而不应按照蛋白质的性质来划分，象过去按照蛋白质的溶解度来分类那样，这样才能真正看出蛋白质的亲缘关系，它们是否具有同源性（homology）。

Levitt与Chothia（1976）按照蛋白质的二级结构将蛋白质分为四大类，（1）α-蛋白——主要由α-螺旋组成，如血红蛋白、细胞色素 C；（2）β-蛋白——主要由β-折迭片组成，如胰蛋白酶、大豆胰蛋白酶抑制剂；（3）α/β蛋白——α-螺旋与β-折迭交替装配，通常β-折迭位于中央，两边围绕α-螺旋，如磷酸丙糖异构酶；（4）α+β蛋白——蛋白质由α-螺旋及β-折迭片组成，但在肽链中并非交替存在，如葡萄球菌核酸酶、嗜热菌蛋白酶。

Richardson（1982）研究了100多种蛋白质的三维结构，按照组成结构域的二级结构的排列方式，将蛋白质分为四大类，即：

（1）反平行α域；

（2）平行α/β域；

（3）反平行β域；

（4）富含二硫键或富含金属的小蛋白。

每大类下面又分成几个亚类。一种蛋白质的结构域究竟属于哪一类，不是看它所含二级结构的百分率，而是看二级结构所形成的核心（core）属于哪一类。在这100种蛋白质中以平行α/β域及反平行β域数量最多，各占30—35%，小蛋白最少，约12%。

1.反平行α域（antiparallel α domains）

这类蛋白质除去含有α-螺旋外，很少含有其它结构，这些α-螺旋的最简单连接方式是反平行排列。这大类又可分为2个亚类：

（a）上下螺旋束（up and down helix bundle）。这类蛋白质通常由4个α-螺旋组成，形成二层螺旋束，一上一下地相互连接，故称为上下螺旋束。例如，细胞色素C′，细胞色素b_{562}，TMV外壳蛋白，及蚯蚓血红蛋白（myohemerythrin）（图6·11）。

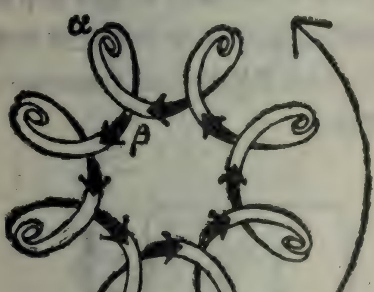
（b）Greek Key螺旋束。这类蛋白的α-螺旋束的排列具有希腊钥匙（Greek Key）的样式，故称为Greek key螺旋束。它们是反平行α-结构中最重要的一类，包括珠蛋白（globin），如肌红蛋白（myoglobin）及血红蛋白（hemoglobin）。存在于许多哺乳动物、昆虫以至于豆科植物根瘤中，根瘤中的珠蛋白即豆血红蛋白（Leghemoglobin）。此外还有嗜热菌蛋白酶（therm-

olysin），木瓜蛋白酶 (papain)，T_4噬菌体溶菌酶等（图6.12)。

2.平行α/β域 (parallel α/β domains)

这是蛋白质中最大的一类，包含有许多种蛋白质，它们含有平行的β-折迭片（或混合的β-折迭片）。两股β-折迭片靠α-螺旋连接起来，通常这些α-螺旋也是平行的，α-螺旋与β-折迭片之间的连接为反平行的，但是β-折迭与β折迭之间及α-螺旋与α-螺旋之间的连接则是平行的，因此总称为平行的α/β结构域。

(a) 单绕平行β-桶 (single wound parallel β barrel)。在这类蛋白质中β-折迭至少有4或5条，α-螺旋3或4个，所有平行α/β蛋白都具有三层结构（甚至四层结构）（图6·9)。例如，磷酸丙糖异构酶由8条平行β-折迭片组成（β-桶状），在β-折迭与β-折迭之间由α-螺旋连接起来。这种结构不打结，称为单绕平行β-折迭桶（图6·13）。



(a)

图6·9 单绕β-折迭桶形成过程的示意图

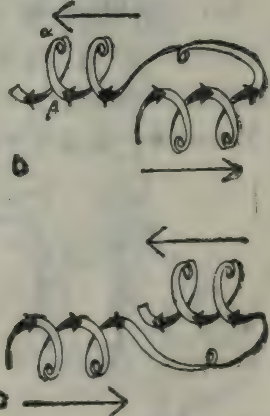


图6·10 双绕β-折迭的示意图

(b) 双绕β-折迭 (claoli Doubly wound β-sheet)。此外还有一些β-折迭桶是双绕的，如图6·10。

具有双绕β-折迭的蛋白质很多，如乳酸脱氢酶 (LDH)，醇脱氢酶等 (图6·14)。

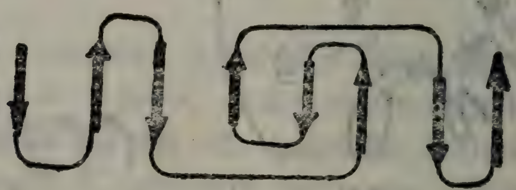
3.反平行β域 (antiparallel β domains)

另一类主要的结构域类型是反平行β-折迭，具有这种结构的蛋白质在数量上与平行α/β域大致相同。

大多数反平行的β-结构域形成桶状 (barrel) 或柱状 (cylinder)，它们不象平行β-桶那样形状对称，如磷酸丙糖异构酶，而大多数由反平行β-折迭片形成桶状，在蛋白质中更为常见。这类蛋白质又可分为下列三个亚类：

(1) 上下反平行β-桶 (up and down antiparallel β-barrel)。这类蛋白质或结构域由 4 至 6 条β-折迭组成，例如木瓜蛋白酶结构域2即由6条β-折迭片组成，这些β-折迭片是上下排列的 (图6·15)。

(2) 希腊钥匙β-桶 (Greek key β-barrel)。在蛋白质中最常见的反平行β-桶结构为希腊钥匙结构，它们的β-折迭排列成希腊花瓶的花纹形状。例如Cu、Zn超氧物歧化酶 (superoxide dismutase) 就是一个典型的例子。



这些希腊钥匙β-桶具有相同的手性，从蛋白质的外部看，希腊钥匙形成一个反时针方向的漩涡 (swirl) (图6·16)。

（3）开放式三明治反平行 β–折迭（Open-face sandwich antiparallel β–sheet）。这类蛋白质具有两层结构，一层为 α–

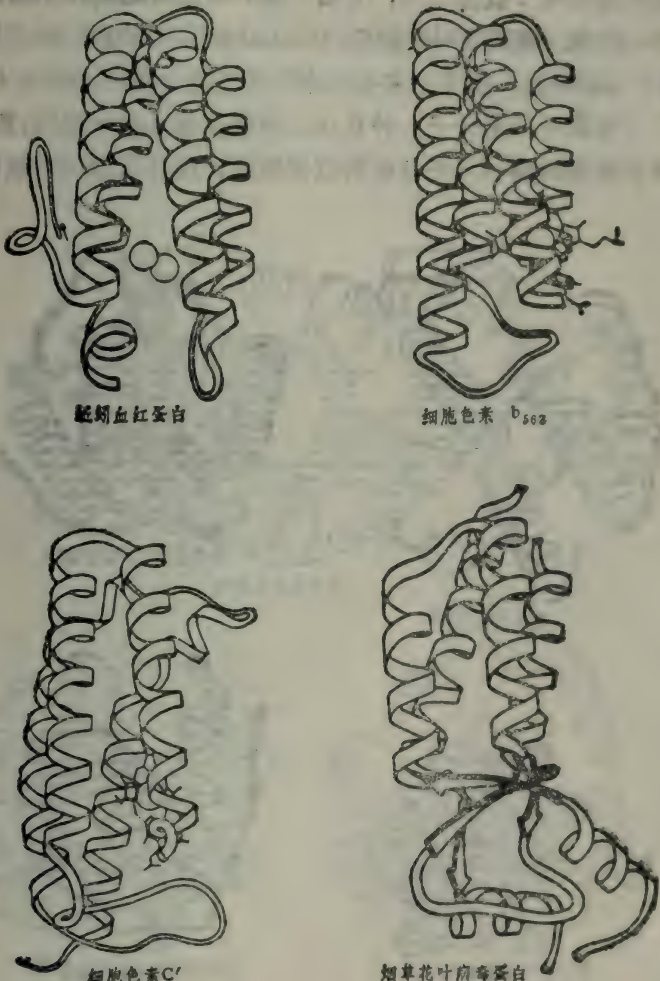
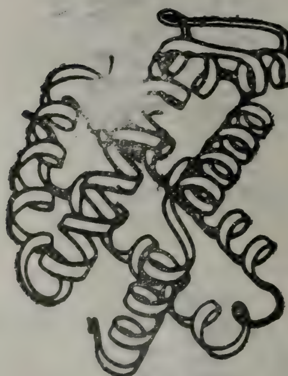
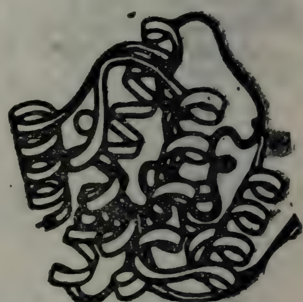


图6·11 反平行α：上下螺旋束

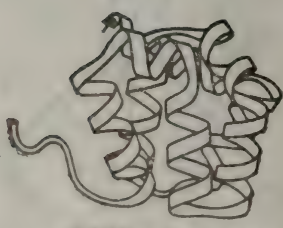
螺旋覆盖在一层β-折迭层上面，好象一块三明治，但是缺少上面一片面包，因此称为开放式的三明治。例如，磷酸甘油醛脱氢酶的结构域 2 就是一种，它由10条β-折迭片组成，上面覆盖3个α-螺旋。细菌叶绿素蛋白 (bacteriochlorophyll protein) 由3个亚基组成，每个亚基由15条β-折迭层上结合着均匀分布的 7 个细菌叶绿素分子，并且在上面覆盖着 6 条α-螺旋。此外，谷胱甘肽还原酶、天冬氨酸转氨甲酰酶、嗜热菌蛋白酶都属于



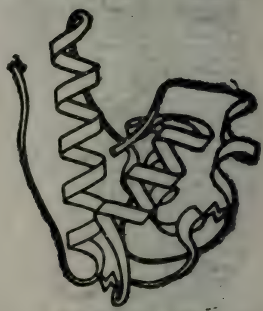
血红蛋白β亚基



嗜热菌蛋白(结构域2)



噬菌体T_4溶菌酶(结构域2)



木瓜蛋白酶(结构域1)

图6·12 反平行α：希腊钥匙螺旋束

这一类（图6·17）。

4.富含-S-S-或富含金属的小蛋白（small S-S- rich or metal-rich domains）

这类蛋白质的分子较小，它们的氨基酸残基数通常小于100，有一些含有较大量的S-S键，另一些则含有配位金属，现在把它们归为一类。

富含S-S键的小蛋白，包含有毒素蛋白（如erabutoxin含4对

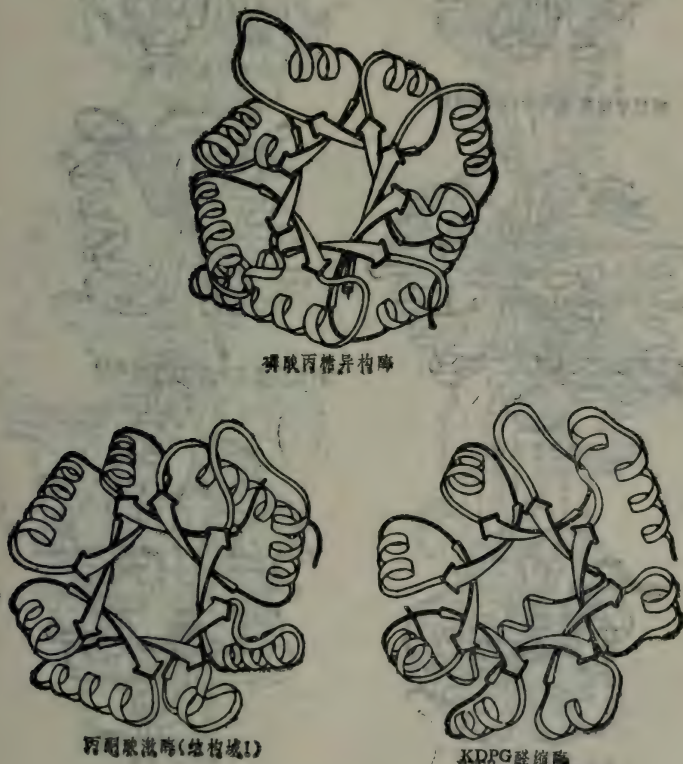


图6·13 平行α/β，单绕平行β桶

S–S键），酶抑制剂（如胰蛋白酶抑制剂含3对S–S键），麦胚凝集素（wheat germ agglutinin，WGA）（图6·18）。

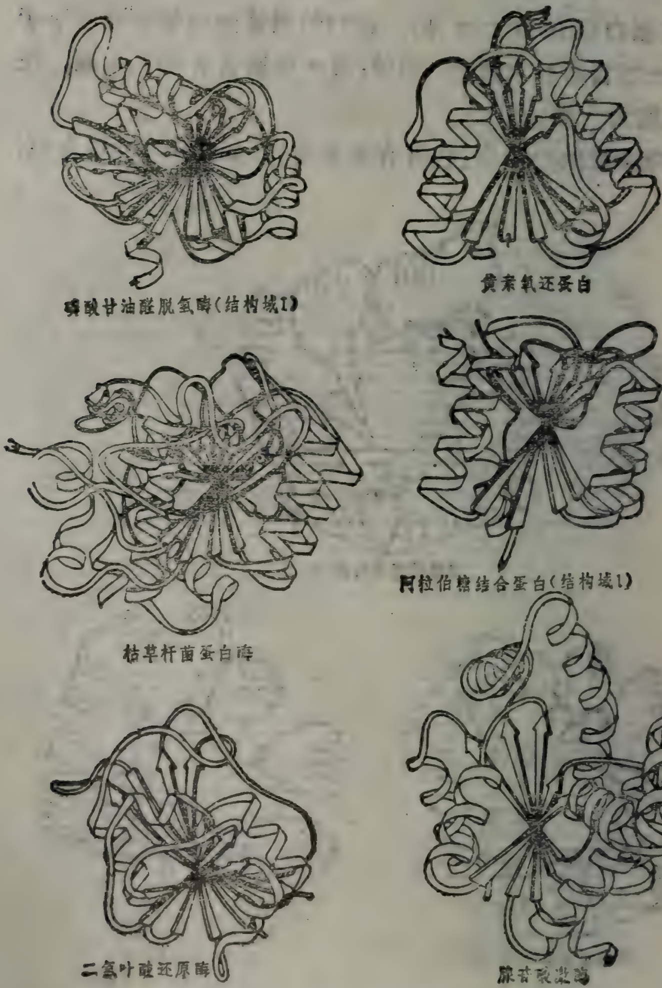


图6·14 平行α/β，双绕平行β-折迭片

富含金属的小蛋白包含铁氧还蛋白(ferredoxin，含有Fe)，红氧还蛋白(rubredoxin，含有Fe)。细胞色素c、细胞色素c_2、



图6·15　反平行β：上下反平行β-桶

细胞色素b_5都含有铁卟啉(图6·18)。

本节所附的插图，就是J.S.Richardson 按照蛋白质分类的

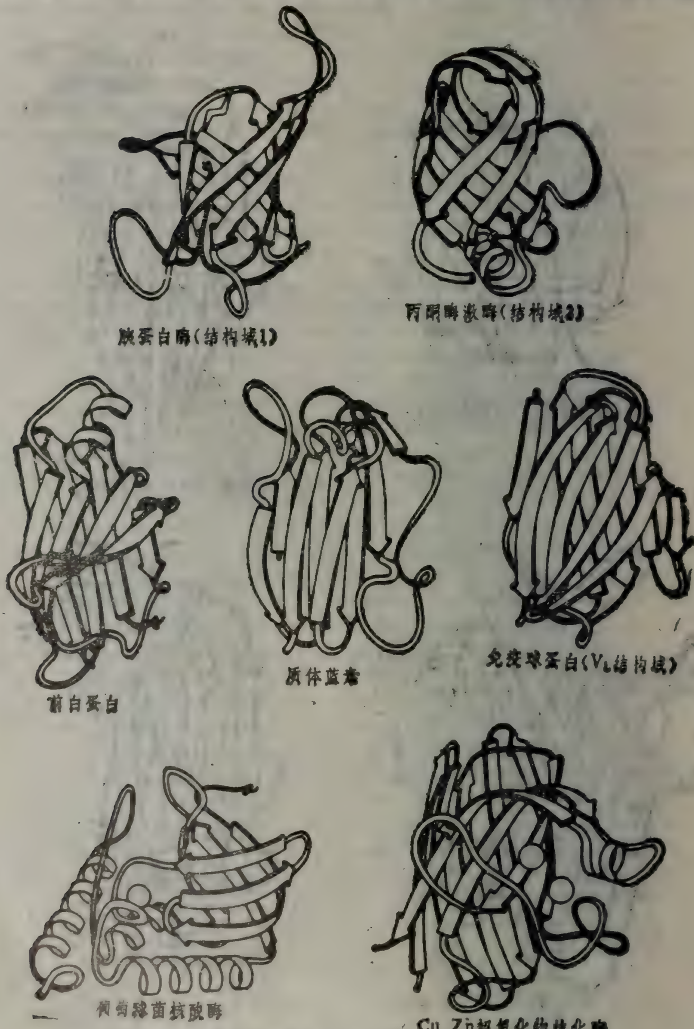


图6·16　反平行β：希腊钥匙β-桶

四大类绘出的蛋白质的三级结构的一部分，有些是蛋白质的某

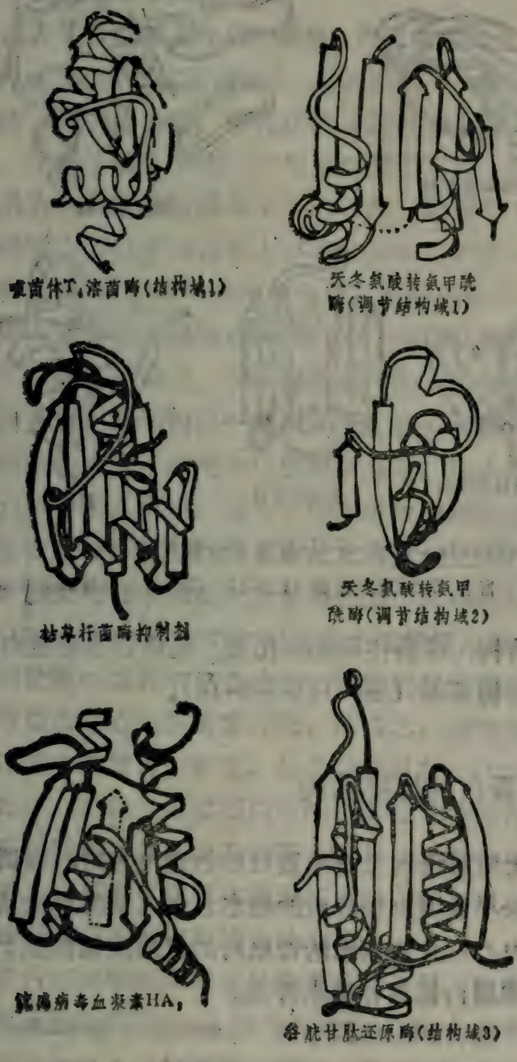


图6·17　反平行β：开放式三明治β-折迭片

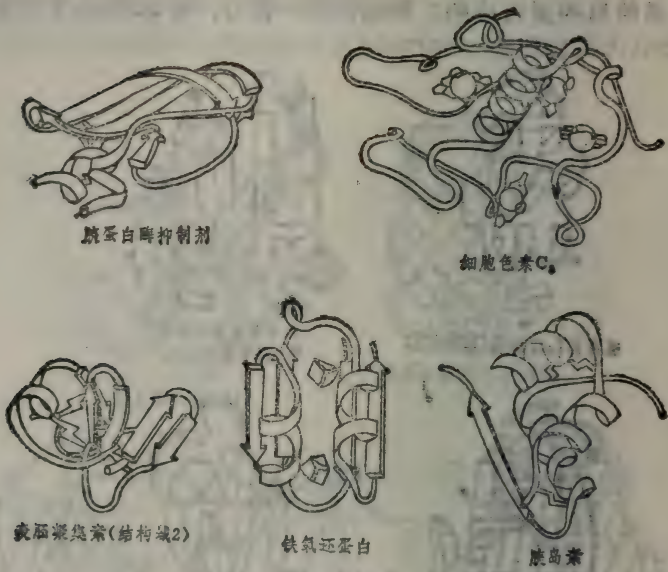


图6·18　富含-S-S-及富含金属的小蛋白

(a)　富含-S-S-的小蛋白（1,3,5）（b）富含金属的小蛋白（2,4）

个结构域的结构，读者仔细加以比较，就可以了解蛋白质结构的一些基本结构原则（图6·11至图6·18）。

三、膜蛋白的特殊结构

我们在上面讨论到负责球蛋白质折迭的力时，强调球蛋白的最后结构要尽量减少蛋白质的疏水表面（使疏水残基位于蛋白质分子的中心），并使亲水的带电荷的氨基酸侧链位于分子表面。因此，球蛋白都具有亲水特性。

但是位于生物膜上的膜蛋白（membrane proteins）则与一般球蛋白不同，具有特殊的结构。因为膜蛋白分子的大部分位

于生物膜中的高度疏水的环境中，由此膜蛋白的结构与大多数球蛋白存在着基本上的区别。

在这方面研究得最彻底的膜蛋白是细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin，或称细菌调理素)。视紫红质 (rhodopsin) 为哺乳动物的一种视觉色素，由杆状的视蛋白加上视黄醛(retinal)所组成。生活于盐池中的一种细菌的膜上存在一种细菌视紫红质，它具有光驱动的跨膜质子泵的功能。通过电子显微镜技术已经得到这个蛋白在细菌膜上存在的结构呈初步的三维图象。这个蛋白质由247个氨基酸残基组成，它们构成7个α-螺旋，其长轴大体与膜的表面相垂直(图6·19)，根据计算，几乎所有多肽链都用以形成α-螺旋，因此螺旋之间的连接是很短的。

在细菌膜内的结构以α-螺旋为主。我们曾经讨论过，α-螺旋为二级结构，其骨架完全由氢键所稳定，除去两端为例外，因此它们容易插入膜内。因为它没有未被饱和的氢键，否则这些氢键基团要与水相互作用才能使之保持稳定。再者，这种蛋白质的α-螺旋的疏水侧链可以暴露在膜中的疏水环境中，用中子衍射 (neutron diffraction)实验证明缬氨酸定位于外表面，这种排列使得α-螺旋中存在的带电荷的氨基酸侧链彼此相互作用，并与蛋白中心的视黄醛作用。简言之，膜蛋白的结构与存在于水环境中的球蛋白相比，好象是翻里向外(inside-out) 的样子。此外，现在牛的膜蛋白中的视紫红质的结构也已经测定出来，有兴趣的是最近发现衣藻 (Chlamydomonas) 感光后能进行运动，从其中也分析出视紫红质来。图6·19，图6·20就是视紫红质及其与生物膜相结合的结构。

膜蛋白在生物膜中起着异常重要的作用，如质子泵、ATP酶、红细胞膜的带3(band 3)等在离子传递、合成ATP上有重要功能。因此，深入了解膜蛋白的结构将成为今后研究蛋白质结

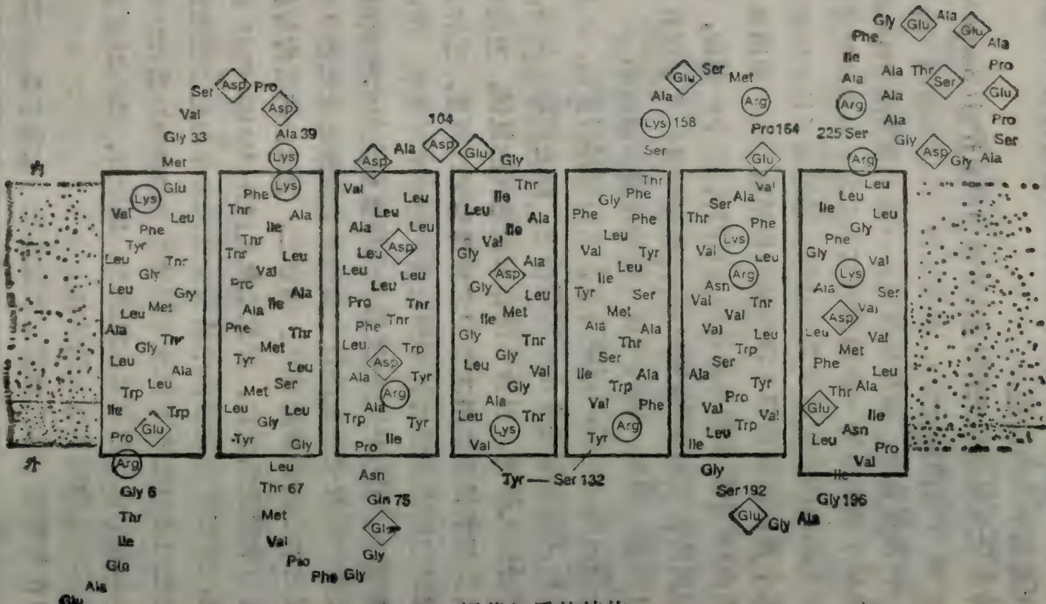


图6·19　视紫红质的结构

（图中的氨基酸顺序形成7段螺旋）

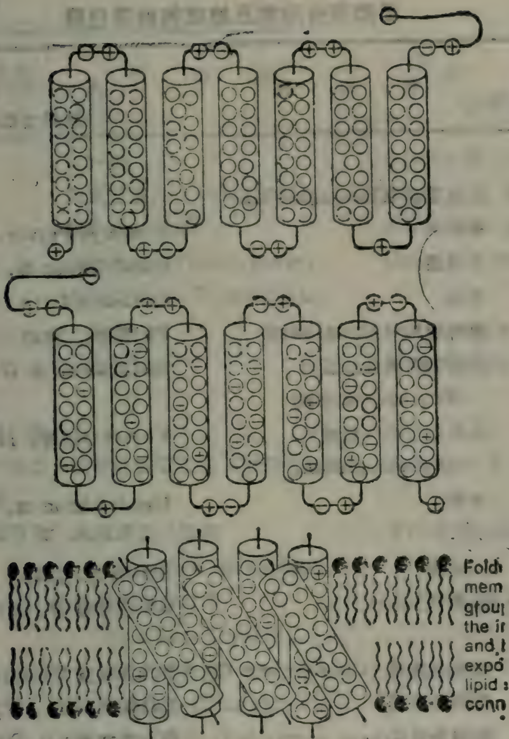


图6·20 细菌视紫红质结构的模型

构的重要领域。

目前利用X–射线衍射技术研究蛋白质的晶体结构，已经有100多种蛋白质获得了高分辨率的三维结构。为了便于读者进一步地了解这些蛋白质的结构，我们按照蛋白质的功能分类，在表6·1中列出这些蛋白质的名称、来源和作者，以供参考。

表6·1　已知高分辨率三维结构的蛋白质

按功能分类	蛋白质	作者（最新文献）
氧结合蛋白类		
珠蛋白族	血红蛋白（Hemoglobin）	
	哺乳类	Fermi 及 Perutz, 1981
	八目鳗	Hendrickson 等, 1973
	环虫	Padlan 及 Love, 1974
	肌红蛋白（Myoglobin）	Phillips, 1980
	无脊椎动物血红蛋白（Erythrocruorin）	Steigemann 及 Weber, 1979
	豆血红蛋白（根瘤）（Leghemoglobin）	Vainshtein等, 1977
蚯蚓血红蛋白（Hemerythrins）	单体	Hendrickson 等, 1975
	三聚体	Smith 等, 1983
	八聚体	Stenkamp 等, 1978
氧化还原蛋白类		
细胞色素C族	细胞色素C（Cytochrome C）	Takano 及 Dickerson, 1981
	细胞色素C_2	Salemme 等, 1973
	细胞色素C_{550}	Timkovich 及 Dickerson, 1976
	细胞色素C_{551}	Matsuara 等, 1982
	细胞色素C_{555}	Korszun 及 Salemme, 1977
其它细胞色素	细胞色素b_5	Argos 及 Mathews, 1975
	细胞色素b_{562}	Lederer 等, 1981
	细胞色素c'	Weber 等, 1981
	细胞色素c_3	Pierrot 等, 1982
非血红素	蓝蛋白（Azurin）	Norris 等, 1983
	铁氧还蛋白（Ferredoxins）	
	2-铁	Kukuyama 等, 1980
	7-铁	Howard 等, 1983

续表1

按功能分类	蛋白质	作者（最新文献）
	8-铁	Adman 等，1976
	红氧还蛋白 (Rubredoxin)	Watenpugh 等，1979
	高电位铁蛋白	Carter 等，1974
	质体蓝素 (Plastocyanin)	Guss 及 Freeman，1983
	硫氧还蛋白 (Thioredoxin)	
	细菌	Holmgren 等，1975
	噬菌体	Söderberg 等，1978
蛋白酶类		
丝氨酸蛋白酶		
枯草杆菌蛋白酶	枯草杆菌蛋白酶 (Subtilisin)	Robertus 等，1971
胰蛋白酶族	胰凝乳蛋白酶原 (Chymotrypsinogen)	Freer 等，1970
	α-胰凝乳蛋白酶 (α-Chymotrypsin)	Birktoft 及 Blow，1972
	γ-胰凝乳蛋白酶	Cohen 等，1981
	弹性蛋白酶 (Elastase)	Sawyer 等，1978
	激肽释放酶A (Kallikrein A)	Bode 等，1983
	α-溶解蛋白酶 (α-Lytic protease)	Brayer 等，1979
	Streptomyces griseus 蛋白酶	
	A	Sielecki 等，1979
	B	Delbaere 等，1979
	胰蛋白酶原 (Trypsinogen)	Fehlhammer 等，1977
	胰蛋白酶 (Trypsin)	Bode 及 Schwager，1975
巯基蛋白酶	木瓜蛋白酶 (Papain)	Drenth 等，1971
	猕猴桃蛋白酶 (Actinidin)	Baker 等，1980
羧基蛋白酶	Endothia parasitica 蛋白酶	Wong 等，1979
	青霉菌蛋白酶 Penicillopepsin	James 及 Sielecki，1983

续表2

按功能分类	蛋白质	作者（最新文献）
	猪胃蛋白酶 Pepsin	Andreeva 等，1978
	Rizopus chinensis pepsin	Bott 等，1982
金属蛋白酶	羧肽酶 Carboxypeptidase	
	A	Rees 等，1983
	B	Schmid 及 Herriott，1976
	细菌	Dideberg 等，1982
	嗜热菌蛋白酶（Thermolysin）	Holmes 及 Matthews，1972
脱氢酶类	醇脱氢酶（Alcohol dehydrogenase）	Eklund 等，1976
	磷酸甘油醛脱氢酶（Glyceralde-hyde-P dehydrogenase）	
	龙虾	Buehner 等，1974
	细菌	Leslie 及 Wonacott，1983
	乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase）	Holbrook 等，1975
	苹果酸脱氢酶（Malate dehydrogenase）	Hill 等，1972
	6-磷酸葡糖酸脱氢酶（6-Phosphogluconate dehydrogenase）	Adams 等，1983
激酶类		
	腺苷酸激酶（Adenylate kinase）	Schulz 等，1974
	己糖激酶（Hexokinase）	Anderson 等，1978
	磷酸甘油酸激酶（Phospho-glycerate kinase）	
	酵母	Watson 等，1982
	马	Banks 等，1979
	磷酸果糖激酶（Phospho-fructokinase）	Evans 及 Hudson，1979
	丙酮酸激酶（Pyruvate kinase）	Stuart 等，1979

续表3

按功能分类	蛋　白　质	作　者（最新文献）
其它酶类		
	醛缩酶（Aldolase, KDPG）	Mavridis 等，1982
	碱性磷酸酯酶（Alkaline Phoshatase）	Sowadski 等，1981
	天冬氨酸转氨酶（Aspartate aminotransferase）	Ford 等，1980
	天冬氨酸转氨甲酰酶（Aspartate transcarbamylase）	Honzatko 等，1982
	碳酸酐酶（Carbonic anhydrase）	Lindskog 等，1971
	过氧化氢酶（Catalase）	
	牛	Murthy 等，1981
	真菌	Vainshtein 等，1981
	柠檬酸合成酶（Citrate Synthetase）	Remington 等，1982
	细胞色素C过氧化物酶（Cytochrome c peroxidase）	Poulos 等，1980
	二氢叶酸还原酶（Dihydrofolate reductase）	Bolin 等，1982
	铁氧还蛋白还原酶（Ferredoxin reductase）	Sheriff及 Herriott，1981
	黄素氧还蛋白（Flavodoxin）	Smith 等，1983
	6-磷酸葡糖异构酶（Glucose-6-P isomerase）	Shaw 及 Muirhead，1977
	谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase）	Epp 等，1983
	谷胱甘肽还原酶（Glutathione reductase）	Thieme 等，1981
	乙醇酸氧化酶（Glycolate oxidase）	Lindquist及Bränden，1980

续表4

按功能分类	蛋白质	作者 (最新文献)
	P-羟基苯甲酸羟化酶 (P-Hydroxybenzoate hydroxylase)	Wierenga 等, 1979
	溶菌酶 (Lysozyme)	
	鸡	Imoto 等, 1972
	人	Artymiuk及Blake, 1981
	噬菌体	Remington 等, 1978
	Streptomyces	Harada 等, 1981
	超氧物歧化酶 (Superoxide dismutase)	
	Cu, Zn	Tainer 等, 1982
	Fe	Ringe 等, 1983
	高峰氏淀粉酶A (Takaamylase)	Matsuura 等, 1980
	磷酸丙糖异构酶	Phillips 等, 1978
	tRNA合成酶 (tRNA synthetase)	
	甲硫氨酰	Zelwer 等, 1982
	酪氨酰	Bhat 等, 1982
免疫球蛋白		
L链二聚体	Mcg	Edmundson 等, 1975
V_L二聚体	Rei	Epp 等, 1974
	Au	Fehlhammer 等, 1975
	Rhe	Furey 等, 1983
	Roy	Colman 等, 1977
Fab片段	New	Saul 等, 1978
	M603	Segal 等, 1974
	Kol	Matsushima 等, 1978
Fc片段		Deisenhofer 等, 1980
完整IgG	Kol	Marquart 等, 1980
	Dob	Silverton 等, 1977
凝集素		

续表5

按功能分类	蛋白质	作者（最新文献）
	伴刀豆球蛋白A(ConcanavalinA)	Reeke 等, 1975
	麦胚凝集素（Wheat germ agglutinin)	Wright, 1976
抑制剂及毒素		
	牛胰胰蛋白酶抑制剂（Bovine pancreatic trypsin inhibitor)	Deisenhofer及Stoigemann, 1975
	分泌的胰蛋白酶抑制剂（Secretory trpsin inhibitor)	Bdognesi 等, 1983
	羧肽酶A抑制剂（Carboxy-peptidase A inhibitor)	Rees 及 Lipscomb, 1982
	Mellitin	Terwillige 及 Eisenberg, 1982
	卵类粘蛋白片段（Ovomucoid fragment)	Papamokos 等, 1982
	蝎神经毒素(Scorpion neurotoxin)	Fontecilla-Camps 等,1980
	蛇神经毒素(Snake neurotoxin)	Low 等, 1976
	短	
	长	Walkinshaw 等, 1980
	大豆胰蛋白酶抑制剂（Soybean trypsin inhibitor)	Sweet 等, 1974
	枯草杆菌蛋白酶抑制剂（Subtilisin inhibitor)	Mitsui 等, 1979
激素		
	胰增血糖素（Glucagon)	Sasaki 等, 1975
	胰岛素（Insulin)	Blundell 等, 1972
	胰多肽(Pancreatic polypeptide)	Blundell 等, 1981
病毒		
	流感病毒（Influenza virus)	

续表6

按功能分类	蛋白质	作者（最新文献）
	血凝素（Hemagglutinin）	Wilson等，1981
	神经氨酸酶（Neuraminidase）	Varghase等，1983
	卫星烟草坏死病毒（Satellite tobacco necrosis virus）	Liljas等，1982
	南方菜豆花叶病毒（Southern bean mosaic virus）	Rossmann等，1983
	烟草花叶病毒衣壳蛋白（Tobacco mosaic virus coat protein）	Bloomer等，1978
	番茄矮丛病毒（Tomato bushy stunt virus）	Harrison等，1978
其它蛋白质	过敏毒素（Anaphylatoxin C_3a）	Huber等，1980
	阿拉伯糖结合蛋白（Arabinose-binding protein）	Gilliland及Quiocho，1981
	细菌叶绿素a蛋白（Bacterio-chlorophyll a protein）	Matthews等，1979
	刀豆球蛋白（Canavalin）	Mc Pherson，1980
	降解代谢基因激活剂（Catabolite gene activator）	Mckay等，1982
	Crambin	Hendriokson及Teeter，1981
	Cro阻遏物（Cro repressor）	Anderson等，1981
	晶体蛋白（Crystallin）	Blundell等，1981
	延长因子（Elongation factor Tu）	Morikawa等，1978
	铁蛋白（Ferritin）	Banyard等，1978
	半乳糖结合蛋白（Galactose-binding protein）	Mowbray及Petsko，1983
	基因5产物	Brayer及McPherson，1983
	λ-阻遏物（λ-repressor）	Pabo及Lewis，1982

续表7

按功能分类	蛋白质	作者（最新文献）
	微小清蛋白 (Parvalbumin)	Moews 及 Krestsinger, 1975
	前白蛋白 (Prealbumin)	Blake 等, 1978
	Staphylococcas aureus 蛋白A	Beisenbafer, 1981
	核糖体蛋白L7/L12片段 (Ribosomal protein L7/L12 fragment)	Leijoomarck 等, 1980
	子宫珠蛋白 (Uteroglobin)	Mornon 等, 1980
	依赖维生素D的Ca^{2+}结合蛋白 (Vitamin D-dependent Ca^{2+} binding protein)	Szebenyi 等, 1981

参考文献

1. Richardson, J. S.: The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, Adv. Protein Chem. 34:167—339, 1981.
2. Creighton, T. E.: Proteins Structure and Molecular Principles, Freeman & Co, 1983.
3. Rossman, M. G. & Argos, P.: Protein Folding Ann. Rev. Biochem., 50:497—532, 1981.

第七章　四级结构

一、引言

大多数分子量较大的蛋白质都是由几个具有三级结构的亚基（subunit）组成的，这些亚基的聚合物称为四级结构（quaternary structure）。四级结构的概念首先是由英国著名结晶学家Bernal(1958)提出的。

蛋白质的一个亚基并不一定就是一条多肽链，例如，α-胰凝乳蛋白酶由三条A链、B链和C链组成，并不算含有三个亚基。胰岛素由A链和B链组成，只构成一个亚基。大多数蛋白质的亚基数目是较小的，因此，Monod等(1965)提出寡聚蛋白（oligomer protein)的概念，意味着蛋白质是由少数相同亚基组成的。在寡聚蛋白中的亚基称为原体（protomer)。亚基指的是蛋白质中任何可以看作相同的或不同的亚分子实体（submolecular entity)。例如，在血红蛋白中，α-链及β-链为亚基，而(α/β)则为原体。单体（monomer）表示具有独特结构多肽链的蛋白质。

四级结构不是靠共价键结合的，而是靠非共价键结合的，如氢键、范德华力、盐桥等。

球蛋白聚合成四级结构有很多好处，至少有下列四个优点：

1.四级结构可以形成一个更加复杂的蛋白质结构，以便执行更为复杂的功能。例如，二磷酸核酮糖羧化酶（ribulase bisphosphate carboxylase ruBPCase）由8个大亚基和8个小亚基组成，可以在光合作用中固定空气中的CO_2。

2.四级结构可以把中间代谢途径中的酶集合在一起，加强催化效率，避免中间产物的浪费。例如，核糖体中除含有多种核糖体RNA（rRNA）外，还含有几十种蛋白质，就是一个协作极好的例子。

3.四级结构可以建造具有一定几何图形的结构，例如，长形的管状，烟草花叶病毒就是由TMV外壳蛋白构成其长形的棒状病毒，中心为 RNA 。生物运动器官的鞭毛或纤毛中的微管（microtubule）由几百个α-微管蛋白（α-tubulin）及β-微管蛋白（β-tubulin）聚合成管状结构。

4.四级结构由于亚基的聚合可以适当降低溶液的渗透压。

二、四级结构的对称性

四级结构的蛋白质聚合物的寡聚体具有几何形状的对称性，大致可以分为以下几类。

1.不对称的聚合物（Asymmetrical aggregates）

典型的不对称聚合物为核糖体，它分为大小两个亚基，含有几十种蛋白质和 rRNA。在极其复杂的蛋白质合成过程中需要各种不同的酶和蛋白质。不相同的蛋白质只能够聚合成不对称的聚合物。

2.对称的聚合物（Symmetrical aggregates））

大部分聚合物是对称的，这类又可以分为下列三亚类：

（1）空间对称（Space symmetry）。在胰岛素（insulin）结

晶中存在空间对称性，它们在胰岛中产生，作为储藏形式，可以降低渗透压。在脊椎动物和昆虫中的横纹肌中也观察到同类的对称。

（2）线对称(Linear symmetry)。线对称存在于微管，TMV及丝状噬菌体(filamentous phages)。

（3）点对称(Point symmetry)。点对称在四级结构中最为常见，构成四级结构的原体可以排列成二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体，最多可以聚合成六十聚体等(图7·1，7·2，7·3)。

A．二聚体(dimer)。二聚体具有C_2对称性，每个原体靠中轴旋转360°/2(180°)就可以与另一个原体完全重合。例如酵母己糖激酶(yeast hexokinase)、前白蛋白(prealbumin)、醇脱氢酶(ADH)等。

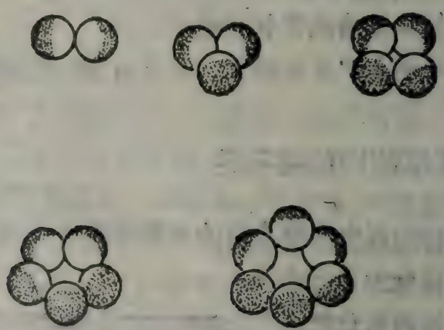


图7·1　点对称的几种聚合体

(a) 二聚体　(b) 三聚体　(c) 四聚体　(d) 五聚体　(e) 六聚体

B．三聚体(trimer)。三聚体的四级结构要转360°/3(120°)才能与另一原体吻合，它们具有C_3对称性(C_3 symmetry)。例如，光合细菌中的细菌叶绿素蛋白及高等植物叶绿体中的捕光叶绿素蛋白都具有三聚体的结构。

C．四聚体(tetramer)。四聚体具有D_2对称性。它们形成四

面体(tetrahedron)，四聚体也可以形成原体的正方形排列(square arrangement)。例如，血红蛋白、乳酸脱氢酶(LDH)、伴刀豆球蛋白A(ConA)及磷酸甘油醛脱氢酶(GPDH)等。

D.五聚体。五聚体可以形成一个五角体（paragon），这类蛋白质不多。

E.六聚体(hexagon)。六聚体由六个亚基组成。例如，胰岛素和天冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase) 都属于六聚体。

F.八聚体(octamer)。八聚体构成八面体(octahedron)。

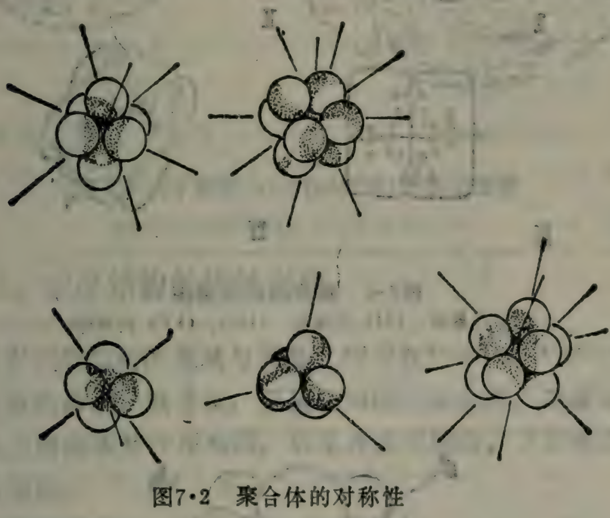


图7·2 聚合体的对称性

G.十二聚体(dodecamer)。十二聚体(图7·4)的蛋白质有天冬氨酸β-脱羧酶(aspartate β-carboxylase)，丙酮酸激酶(pyruvate kinase)。

H.二十四聚体(24 subunits)。二十四聚体的蛋白质有二氢脂基转乙酰酶(dihydrolipoyl transacetylase)。

I.六十面体(isosahed on)。很多病毒颗粒具有六十面体的

结构，甚至180面体的结构，如番茄矮丛病毒(TBSV)和南方菜豆花叶病毒(SBMV)(图7·5)。

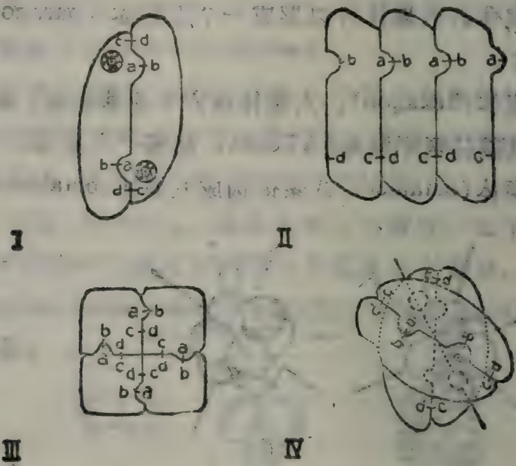


图7·3　寡聚酶的示意图
(I) 二聚体　(II) 三聚体　(III), (IV) 四聚体

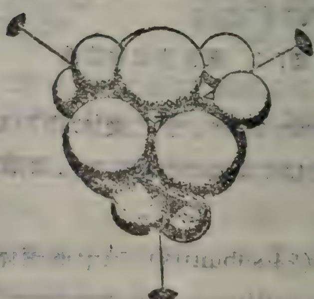


图7·4　十二聚体

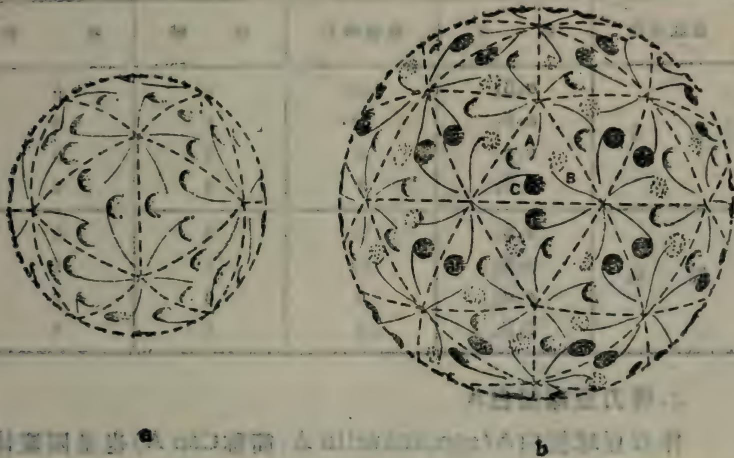


图7·5　六十面体(a)与180面体(b)的示意图

三、四级结构的接触表面

具有四级结构的亚基与亚基之间存在Van Der Warls 力、氢键及少数盐桥。一般来说，亚基之间的接触愈多，则蛋白质与蛋白质之间的相互作用愈强，这是容易理解的。下面举几个例子予以说明。

1.血红蛋白

血红蛋白由二个α-亚基及二个β-亚基组成，而其中$\alpha_1\beta_1$亚基间的接触(contact)最强。

在氧合血红蛋白(oxyhemoglobin)及脱氧血红蛋白(deoxyhemoglobin)中，$\alpha_1\beta_1$(或$\alpha_2\beta_2$)的接触面积(contact surface)比$\alpha_1\beta_2$(或$\alpha_2\beta_1$)相互作用为强，至于$\alpha_1\alpha_2$(或$\beta_1\beta_2$)的接触更少，这个现象从表7·1的数据可以明显地看出来。

表7·1　血红蛋白α与β亚基间的范德华力、氢键及盐桥数目

血红蛋白	组合	范德华力	氢键	盐桥
氧合	$\alpha_1\beta_1$	110	5	0
	$\alpha_2\beta_2$	80	1	0
	$\alpha_1\alpha_2$	0	0	0
	$\beta_1\beta_2$	0	0	0
脱氧	$\alpha_1\beta_1$	98	5	0
	$\alpha_2\beta_2$	69	1	1
	$\alpha_1\alpha_2$	0	0	2
	$\beta_1\beta_2$	0	0	0

2.伴刀豆球蛋白A

伴刀豆球蛋白A(concanavalin A，简称Con A)也是四聚体，分别命名为I、II、III、IV。它们之间的非共价键如表7·2。

表7·2　伴刀豆球蛋白A亚基间的非共价键

亚基	范德华力	氢键	盐桥
I—II	250	14	0
I—III	156	4	2
I—IV	16	2	0

Con A 分子中亚基之间接触实际上相当于 β-折迭层的继续。在Con A 中亚基I—II之间的接触最强，因为它们之间含有14个氢键，而亚基I—IV之间的接触最弱，只有两个氢键。

3.溶液中的四聚体

在溶液中 ConA、胰岛素、α-胰凝乳蛋白酶是以二聚体的结构为主，四聚体与二聚体及单体保持一定的平衡。ConA 的二聚体表现活性最强，同时二聚体I—II是最稳定的结构。胰岛素在溶液中其六聚体与二聚体及单体也保持一定的平衡。其二

聚体结合到激素受体(hormone receptor)上，可能是很重要的。

四、寡聚蛋白的存在及其结构特点

1.蛋白质中亚基数目

Darnall与 Klotz (1972)曾经比较研究过500种蛋白质亚基的组成数目，其结果如图7·6。

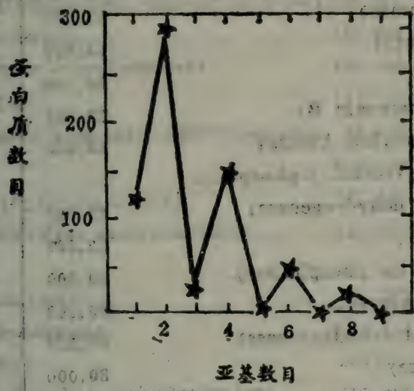


图7·6　蛋白质中亚基数目的分布

由图7·6可见，在蛋白质中以二聚体出现的频率最高，其次为四聚体、六聚体，八聚体很少。蛋白质中亚基数目及其对称性的测定主要是靠电子显微镜和X-射线结晶学。

2.寡聚蛋白中亚基之间的界面问题

蛋白质四级结构亚基之间存在界面(interface)，通常埋藏在亚基界面的面积大部分是由非极性残基组成的。Chothia 等(1976)曾经测定过脱氧血红蛋白及高铁血红蛋白(methemoglobin)亚基之间的表面积，大约有1/5处于亚基界面上。在界面上有60%为$\alpha_1\beta_1$，$\alpha_1\beta_2$接触紧密。包括在这些接触界面上大部分

表7.3　蛋白质的亚基组成

蛋白质	分子量	亚基	
		数目	分子量
胰岛素 (Insulin)	11,466	2	5,733
α-淀粉酶 (α-Amylase)	50,000	2	25,000
磷酸丙糖异构酶 (Triose phosphate isomerase)	53,000	2	26,500
Neurospora 苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase)	54,000	4	13,500
人前白蛋白 (Prealbumin)	62,000	4	15,500
血红蛋白 (Hemoglobin)	64,500	4	16,000
鼠肝苹果酸脱氢酶	66,300	2	37,500
原肌球蛋白B (Tropomyosin B)	68,000	2	33,500
鼠肝腺苷酸激酶 (Adenylate kinase)	68,000	3	23,000
3-磷酸甘油脱氢酶 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase)	68,000	2	34,000
牛心苹果酸脱氢酶	72,000	2	37,000
碱性磷酸酯酶 (Alkaline phosphatase)	80,000	2	40,000
肌酸激酶 (Creatine kinase)	80,000	2	40,000
肝醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase)	80,000	2	41,000
酵母醛缩酶 (Aldolase)	80,000	2	40,000
酸性磷酸酯酶 (Acid phosphatase)	85,000	2	42,000
酵母烯醇酶 (Enolase)	88,000	2	44,000
丙酮酸脱氢酶 (Pyruvate dehydrogenase)	90,000	2	45,000
萤火虫荧光素酶 (Luciferase)	92,000	2	52,000
琥珀酸脱氢酶 (Saccinate dehydrogenase)	97,000	1	70,000
		1	27,000
柠檬酸合成酶 (Citrate synthetase)	100,000	2	50,000
天冬氨酸转氨酶 (Aspartate aminotransferase)	100,000	2	50,000
酵母己糖激酶 (Hexokinase)	102,000	2	52,000
伴刀豆球蛋白A (Concanavalin A)	108,000	2	54,000
	54,000	2	27,000
蚯蚓血红蛋白 (Hemerythrin)	108,000	8	13,500
微管蛋白 (Tubulin)	110,000	1	56,000
		1	53,000

续表1

蛋白质	分子量	亚基	
		数目	分子量
焦磷酸酶 (Pyrophosphatase)	120,000	6	20,000
菠萝醛缩酶 (Aldolase)	120,000	4	30,000
果糖二磷酸酯酶 (Fructose diphosphatase)	130,000	2	29,000
		2	37,000
猪核苷二磷酸激酶(Nucleoside diphosphokinase)	138,000	6	21,000
转酮酶 (Transketolase)	140,000	2	70,000
乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase)	140,000	4	35,000
3-磷酸甘油醛脱氢酶	144,000	2	72,000
(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	72,000	2	37,000
酵母醇脱氢酶	150,000	4	37,000
酵母丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase)	161,000	8	20,000
组氨酸脱羧酶 (Histidine decarboxylase)	190,000	5	9,000
		5	29,700
延胡索酸酶 (Fumarase)	194,000	4	48,500
甘薯β-淀粉酶 (β-Amylase)	201,000	4	50,000
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	204,800	2	101,400
(Glucose-6-phosphate dehydrogenase)	101,400	2	51,300
异柠檬酸合成酶 (Isocitrate lyase)	206,000	4	48,200
转化酶 (Invertase)	210,000	4	51,500
过氧化氢酶 (Catalase)	232,000	4	57,500
光敏色素 (Phytochrome)	252,000	6	42,000
乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase)	259,000	6	42,000
天冬氨酰转氨甲酰酶	310,000	2	100,000
(Aspartyl transcarbamylase)		3	34,000
	100,000	3	33,000
	34,000	2	17,000
谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase)	320,000	6	57,000
苯丙氨酸解氨酶(Phenyl alanine ammonia lyase)	330,000	4	83,000
脂肪酸合成酶 (Fatty acid synthetase)	450,000	2	230,000
脱氧铁蛋白 (Apoferritin)	460,000	24	18,500

续表2

蛋白质	分子量	亚基	
		数目	分子量
肌球蛋白 (Myosin)	460,000	2	200,000
		2-3	20,000
脲酶 (Urease)	480,000	2	240,000
		3	83,000
二磷酸核酮糖羧化酶	550,000	8	52,000
(Ribulose diphosphate corboxylase)		8	16,000
血蓝蛋白 (Hemocyanin)	300,000—9,000,000		380,000
			70,000
			35,000
无脊椎动物血红蛋白 (Erythrocraorin)	3,000,000	162	18,500
噬菌体fII (Phage fII)	3,620,000	180	13,750
丙酮酸脱氢酶复合体	4,000,000	1	960,000
(Pyruvate dehydrogenase complex)		24	90,000
		12	112,000
	960,000	8	120,000
	120,000	3	40,000
	90,000	2	45,000
	112,000	2	56,000
芜菁黄花叶病毒	5,000,000	150	21,000
(Turnip yellow mosaic virus)			
黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus)	6,000,000	185	21,500
矮丛病毒 (Bushy stunt virus)	9,000,000	120	60,000
马铃薯病毒X (Potato virus X)	35,000,000	650	52,000
烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus)	40,000,000	2130	17,500

摘自 Neurath, H. & Hill, R.L.: The Proteins 3rd ed. Vol.I P.314—324, 1975 Academic Press, New York.

为疏水残基，而极性残基只占32—40%。现将脱氢酶(如LDH)的亚基之间的接触用图7·7表示。

图7·7中亚基以三角形表示，如红色亚基以P、Q、R轴与黄、绿、蓝三种亚基相接触，可以看得很清楚，这已经用小鲨鱼(dogfish)的乳酸脱氢酶的M_4予以证实。

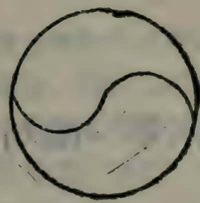


图7·8 太极图代表自我互补的界面

ConA 及胰凝乳蛋白酶的二聚体之间的接触有如我国的太极图（图7·8)，其表面是自我互补的（self complementary)。

3.蛋白质的亚基组成(表7·3)。

参考文献

1. Klotz, M., Darnall, D. W. & N. R. Langerman: Quaternary Structure of Proteins in The Proteins (ed. H. Neurath & R. L. Hill) vol I. P293—411, Academic Press, New York. 1975.
2. Ghelis, C. & Yon, J.: Protein Folding, Academic Press, 1982.
3. Zubay, G.: Biochemistry, Addison-Wesley, 1983.

第八章　酶与催化作用

一、引言

酶（enzymes）是有催化功能的蛋白质。酶能催化各种化学反应，代谢过程就是靠各种酶的催化而进行的，使得细胞内各种物质的代谢能够及时、迅速并且协调地进行。

酶具有高度的专一性和非常强大的催化效率，这是一切人造的催化剂所无法比拟的。酶的最显著的特征之一就是它的作用的专一性（specificity），每种酶只作用于一定的底物上并且只发生一定类型的反应，而无侧反应（side reactions）或副产物（byproducts）产生。在有机化学实验中，进行一种反应如能得到90%的产率，就算很幸运。但是在活细胞中一个反应如有90%的产率则不行。因为代谢途径都是由许多步反应组成的。例如，一个由10步反应组成的代谢途径，如果每步的产物只有90%，则最初的原料只有三分之一会变成终产物。如果没有酶的专一性，细胞很快就会被各种副产物所充塞，而无法生活下去。

酶的另一个显著特征是它的催化效率（catalytic efficiency）异常强大。虽然酶是蛋白质，是相当娇嫩的分子，但是它们在极稀的水溶液中並且在中性pH及温和的温度条件下能够极快地催化化学反应的进行，这与有机实验室恰成鲜明的对照，后者加速化学反应要在高温及极端的pH下才能进行。通常酶反

应的速度比非酶促反应的速度要高2至8个数量级（表8·1），这也是一般催化剂所难以达到的。

酶如何起作用？动力学的研究只告诉我们酶的作用多么迅速，但是它不能告诉我们酶如何催化化学反应。酶作用机理的研究则是探讨酶如何催化化学反应的过程，它描述化学反应进行的一切步骤，包括化学键的断裂及新键的形成。因此，阐明酶作用的机理对理解酶的作用有极其重要的意义。

酶为什么有如此强大的催化能力？这是由于酶可以大大降低化学反应的活化能（energy of activation）的缘故。

一个化学反应，如A→P进行的时候，A分子中有一部分在某一瞬间获得足够的能量，达到一个活化状态，即最不稳定的中间结构，称为过渡态（transition state）。在过渡态，化学键形成或断裂以形成反应的产物的机率最高（图8.1）。一个化学反应的速度与此过渡态分子的浓度成正比。活化能等于在一定温

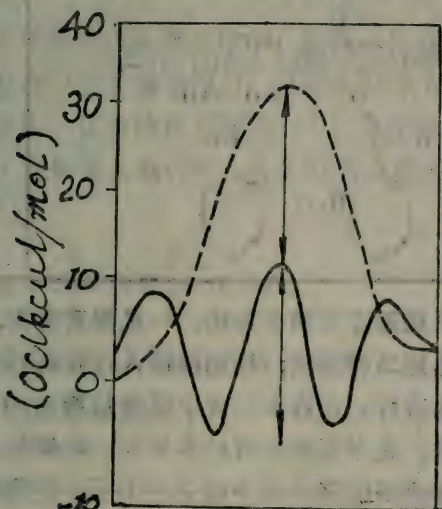
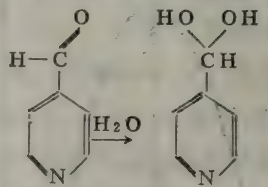


图8·1　过渡态图解

度下将1克分子物质的所有分子都提高到过渡态所需的能量，也就是达到活化能障（activation energy barrier）的顶端。

表8·1　　酶催化与非催化反应的相对速度

（在酶的最适条件下测定）

酶	反　　应	酶催化与非催化反应速度的比率
磷酸丙糖异构酶	$Pi—CH_2—CH(OH)—CHO \longrightarrow Pi—CH_2—C(=O)—CH_2OH$	$3\times10^8—10^9$
丝氨酸蛋白酶	$R_1—C(=O)—NH—R_2 \xrightarrow{H_2O} R_1—C(=O)—OH + NH_2—R_2$	$10^5—10^{10}$
溶　菌　酶	(N—乙酰葡糖苷)$_2 \xrightarrow{H_2O}$ 2N—乙酰葡糖胺	$10^7—10^9$
脲　　酶	$NH_2—C(=O)—NH_2 \xrightarrow{H_2O} CO_2 + 2NH_3$	10^{14}
碳 酸 酐 酶		1.1×10^8

加速化学反应速度有两个办法：一是提高温度，因为它可以增加分子的热运动和能量，增加能进入过渡态的分子数目，从而加速反应的进行。在许多反应中温度每增加10℃，反应速度增加1倍。此外，化学反应也可以靠加入一种催化剂来加速，催化剂与作用物在瞬时间内结合起来产生一个比非催化反应的活化能低得多的过渡态中间产物，因此催化剂以降低活化能的

方式来加速化学反应的进行。当反应产物形成时，自由的催化剂又再生出来。现在我们以过氧化氢在非催化条件下和催化条件下的分解反应为例来说明。

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

反应	活化能（ΔG^*千卡/克分子）
未催化的反应	18
胶体铂催化	13
触酶催化	7

在触酶（catalase 或过氧化氢酶）的作用下，活化能大大降低，触酶催化反应的速度比无催化剂时可以加快10^8倍以上。

二、酶·底物复合物

酶分子不能在远距离起作用。酶的催化首先必须将酶分子与底物结合在一起才能起作用。Michaelis与Menton于1913 年提出一个理论，认为酶作用时酶（E）与底物（S）先结合形成一个酶·底物复合物(ES)，然后ES再分解生成自由的酶(E)与产物（P）。

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \underset{K_{-2}}{\overset{K_{+2}}{\rightleftharpoons}} E + P。$$

从这个公式可以推导出米氏方程式，

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}。$$

米氏常数K_m是反应速度为最大速度一半时的底物浓度。

动力学的研究证明，在催化反应中酶与其底物确实瞬间结

合成酶·底物复合物。由于酶·底物复合物很不稳定，很快即行分解，所以复合物不容易分离出来。不过用物理化学方法可以证明这种复合物确实能够形成。如将酶与底物混合后观察所发生的光谱变化，就是一个很好的方法。含血红素的酶如触酶及过氧化物酶，在加入底物H_2O_2后，它们的辅基血红素的吸收光谱瞬间即发生显著变化，反应出酶·底物复合物的形成与分解。

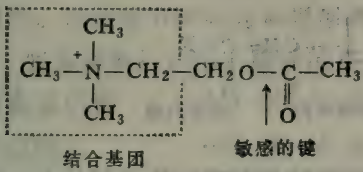
三、酶的活性部位

酶与底物结合时，并非整个酶分子都与底物结合。酶是生物大分子，而底物通常是小分子。在酶分子中与底物结合并进行反应，形成酶·底物复合物的部分称为活性部位（active site）或活性中心（active center）。早在1894年德国大化学家Emil Fischer就发现能水解糖苷的酶能区别糖的立体异构体。这个观察使他提出锁钥学说（lock and key theory）。这个学说认为底物分子必须适合酶的活性部位，它们之间存在互补的关系，底物与酶结合形成酶·底物复合物，底物在酶上的结合部位称为活性部位，它在结构上与底物是互补的，底物适合酶正如钥匙适合锁一样。

酶的活性部位包括两个部分：（1）催化部位（catalytic site），底物有一个敏感的化学键（sasceptible chemical bond），酶的催化部位能攻击底物的敏感的化学键；（2）结合部位（binding site），这个部位使底物与酶分子结合，底物分子结合在酶分子的适当部位上，使催化部位可以攻击底物的敏感的化学键。

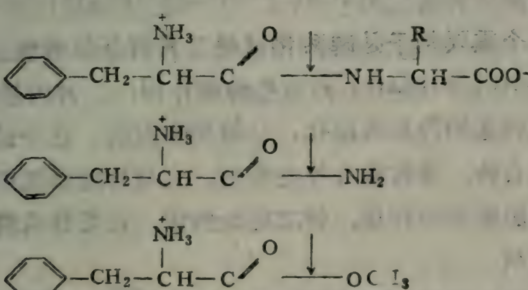
按照互补的原则，底物分子的结构有时可以反映出酶的活

性部位的结构，这可以乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase）为例来说明。虽然底物的敏感键是乙酰基团与胆碱之间的酯键，但是底物结合在活性部位上的必要部分则是连在一个非极性基团上的带正电荷的季胺盐。



乙酰胆碱酯酶的竞争性抑制剂也需要这种结合部位，竞争性抑制剂可以与酶的活性部位结合，但是不能被它作用。

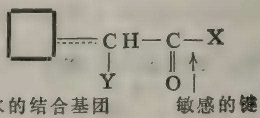
胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin）的底物专一性也可以说明这个问题。胰凝乳蛋白酶是分泌到动物小肠里的一种酶。起初认为它专门水解胃蛋白酶（pepsin）水解蛋白质后所形成的相当长的多肽，但是后来发现胰凝乳蛋白酶也能水解短肽。用各种人工合成的小肽作底物进行试验证明，这个酶是一种内肽酶（endopeptidase），它能裂解一定类型的肽键，不管它在肽链的什么地方。下列的化合物都是胰凝乳蛋白酶可以水解的底物：



用人工合成的底物研究证明，胰凝乳蛋白酶不只能水解肽、芳香族氨基酸的酰胺，而且能水解它们的酯类。酪氨酸的酯是

胰凝乳蛋白酶的最活泼的底物。

从上述人工合成的底物的专一性研究可以得出下列结论：胰凝乳蛋白酶不仅是一个内肽酶，而且是一个疏水的乙酰基的转移酶，它在结构上的最低要求如下：



疏水部分将底物结合在酶的结合部位上，而另一个催化部分则进行乙酰基的转移。

鉴定酶的活性部位的另一个方法是利用化学试剂修改或修饰酶分子中的功能团，以了解这些基团是否为催化反应所必需。典型的例子就是用烷基化试剂进行化学修饰。例如，在pH5.5时用碘乙酸（ICH_2COOH）处理核糖核酸酶（ribonuclease），则酶被烷基化而失去活性。这时形成两种无活性的形式：其一，组氨酸119的咪唑环被烷基化；其二，组氨酸残基12被烷基化，由此可见核糖核酸酶的组氨酸残基12及119一定是催化部位的氨基酸。

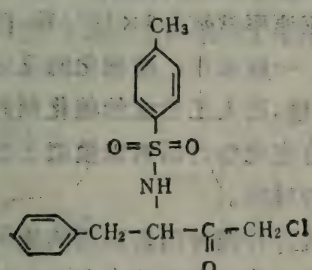
另一个重要例子是磷酸化试剂二异丙基氟磷酸（diisopropyl fluorophosphate）对有些酶的作用，二异丙基氟磷酸能使丝氨酸残基的羟基磷酸化；从而使酶失活。这个试剂是一种有机磷化合物，通常称为神经毒气，它与神经系统中起传导作用的乙酰胆碱酯酶作用，使之完全失活，这类有机磷制剂可以用作杀虫剂。

二异丙基磷酸不但能抑制乙酰胆碱酯酶，而且能抑制活性部位上含有丝氨酸的其它酶类，如胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、葡糖磷酸变位酶以及一些酯酶。在胰凝乳蛋白酶中二异丙基氟

磷酸能够有选择地使195位的丝氨酸残基磷酸化，由此可以确定丝氨酸195是位于酶的活性部位。用这种试剂使酶磷酸化时，再进行部分水解，磷酸丝氨酸可以保持完整，并在肽的碎片中出现。分析这种磷酸化的肽可以告诉我们有关这类酶在活性部位附近的氨基酸顺序。这类酶有时称为丝氨酸酶（serine enzymes）。下面就是一些丝氨酸活性部位附近的氨基酸顺序：

胰凝乳蛋白酶	-甘-天-丝-甘-甘-
胃蛋白酶	-甘-天-丝-甘-脯-
凝血酶	-天-丝-甘-
弹性蛋白酶	-甘-天-丝-甘-
葡糖磷酸变位酶	-苏-丙-丝-组-天-
磷酸化酶	-谷-异-丝-缬-精-

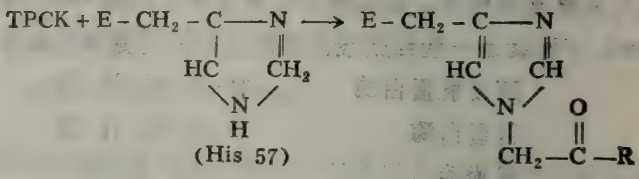
亲和标记（affinity labeling）也可以用作鉴定活性部位中必要功能团的一个方法。人工制备与底物相似的化合物，使之与酶反应，它可以象真正的底物一样与活性部位结合，但它还含有一个能与酶的活性部位上的专一性基团发生共价键反应的基团；下图为胰凝乳蛋白酶的亲和标记反应。亲和标记物N-甲苯磺基-L-苯丙氨酰甲基酮（TPCK）分子的大部分与胰凝乳蛋白酶的正常底物相似，而其反应基团（烷基化基团—CO—CH_2Cl）



TPCK的结构

能与胰凝乳蛋白酶残基57结合。这可以证明组氨酸57及丝氨酸195位于活性部位上。

TPCK与胰凝乳蛋白酶的反应如下：



胰凝乳蛋白酶(E)　　　　(烷基化的咪唑环)

四、对酶催化效率有贡献的因素

酶催化化学反应的效率极高，可以脲的水解为例来说明。

$$NH_2CONH_2 + 2H_2O + H^+ \longrightarrow 2NH_4^+ + HCO_3^-$$

从刀豆中提取的脲酶（urease）可以催化脲的水解反应。在酶不存在时，pH8.0，20℃中此反应的速率常数为 3×10^{-10}/秒，而在有脲酶时，反应速率常数为 3×10^{4}/秒，因此脲酶可以使反应速度加快 10^{14} 倍。一般来说，酶催化的反应通常要比非催化的反应快 10^{8}—10^{20} 倍，而人工合成的催化剂的催化效率都远比酶低得多，因此当前在化学方面常以模拟天然酶的催化效率来提高催化剂的质量为目标。

归纳起来现在认为有四种因素对酶的催化效率有贡献。

(a) 酶与底物分子有一定的结合方式，使底物分子的敏感的化学键与酶的活性部位的催化基团相互邻近，并使其敏感键

与催化基团的取向相同，从而使过渡态容易形成。

(b) 有些酶可以与底物结合成一个不稳定的共价的中间产物，从而容易发生化学反应，形成产物。

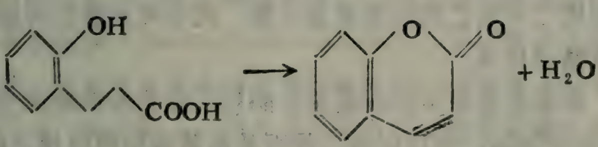
(c) 酶作为质子供体或质子受体，可以进行一般的酸碱催化。

(d) 酶可以诱导底物分子的敏感键发生扭转，从而使键容易被打断。

下面我们就上述四种因素的作用分别加以讨论。

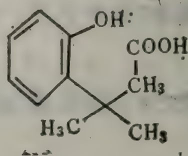
(1) 邻近效应与定向效应。酶加速化学反应速度的最简单的方法是将底物结合或固定在活性部位上，从而大大增加局部面积上底物的有效浓度。由于底物接近酶的表面而使酶的催化活性增加的效应称为邻近效应（proximity effect）。据计算在活性部位上底物的有效浓度可达100M，为一般酶溶液中底物浓度（通常只有0.001M）的10^5倍。因为化学反应的速度是与作用物浓度成正比的，在此局部区域的高浓度下，可以想象反应必然以极大的速率进行，比无酶时反应速度可以加快10^6—10^9倍。

另外还有底物的定向效应（orientation effect）也对提高催化效率有贡献。由于底物分子在酶表面上的立体化学排列使其取向有利于催化反应称为定向效应。例如下式的酸可以脱水形成内酯：



但是下面的三甲基化合物比上述的酸反应更快，这是由于其构象受到高度的限制，在这分子中，—COOH被迫只能与—OH碰

击，因为那三个甲基彼此互相限制，形成一个三烷基锁（trialkyl lock），这个三甲基化合物比上式的反应速率要快 10^{11} 倍以上，这足以说明定向效应的重要。



（2）共价催化。有些酶能加速反应速度是由于形成一个容易进行反应的酶与底物的共价的中间产物，此中间产物有极大的机率进入过渡态，从而使底物找到一个越过活化能障的捷径。由于酶与底物形成共价的中间产物而产生的催化作用称为共价催化（covalent catalysis）。

许多酶能与底物形成酶·底物中间产物，例如胰凝乳蛋白酶能与乙酸对硝基苯酯（p-nitrophenyl acetate）形成共价中间产物：

胰凝乳蛋白酶＋乙酸对硝基苯酯⟶乙酰胰凝乳蛋白酶＋对硝基苯酚(1)

乙酰胰凝乳蛋白酶＋H_2O⟶乙酸＋胰凝乳蛋白酶（2）

反应(1)的速度很快，而反应(2)放出游离的乙酸的速度较慢，在pH低时，乙酰胰凝乳蛋白酶的中间产物相当稳定并且可以分离出来。如果用三甲基乙酸酯作为胰凝乳蛋白酶的底物，则形成三甲基乙酰胰凝乳蛋白酶，此中间产物极为稳定，甚至可以结晶出来。

在催化反应中胰凝乳蛋白酶被乙酰化的功能团为丝氨酸残基195的羟基，它可以被二异丙基氟磷酸处理而使之磷酸化。

酶蛋白的催化作用是由有限的几个功能团所促进的，下列氨基酸如甘氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬

氨酸及脯氨酸不包括在化学催化反应之内。在其余的氨基酸中有些又性质相同，如天冬氨酸与谷氨酸，天冬酰胺与谷酰胺，丝氨酸与苏氨酸，因此构成催化部位的功能团很有限。在酶的催化部位中氨基酸残基主要是由组氨酸、丝氨酸、半胱氨酸及赖氨酸组成。谷氨酸及天冬氨酸的残基在催化部位中也占有一定的地位。

按照与底物反应的氨基酸残基的种类，酶可以分下列四类：

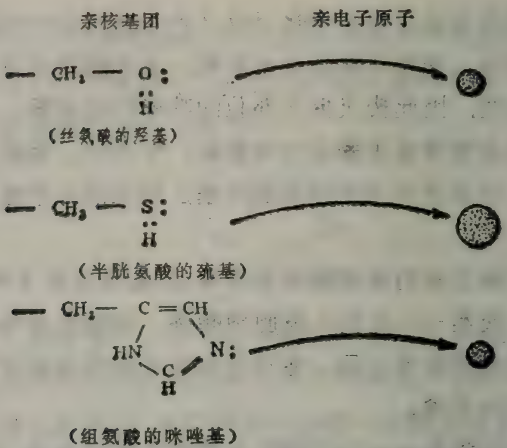
(a) 丝氨酸类——包括乙酰胆碱酯酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶及葡萄糖磷酸变位酶，在这些酶中丝氨酸残基的羟基参与中间产物酯的形成；

(b) 半胱氨酸类——包括磷酸甘油醛脱氢酶及木瓜蛋白酶，在底物的酰基(R–COOH)与酶的活性部位的半胱氨酸 (R′–SH) 之间形成硫酯键 (R–CO–S–R′)；

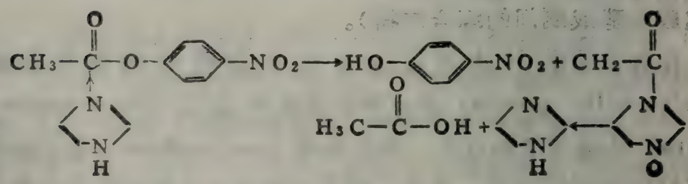
(c) 组氨酸类——包括琥珀酰CoA合成酶，在这类酶的组氨酸残基的咪唑基被磷酸化；

(d) 赖氨酸类——包括二磷酸果糖醛缩酶，在酶的赖氨酸残基的ε–氨基与底物的羰基之间形成中间的Schiff碱(Schiff碱为伯胺与醛或酮间的综合产物)。

在共价催化中最常见的反应是催化剂的亲核基团 (nucleophilic groups) 对底物的亲电子基团 (electrophilic groups) 的碳原子的攻击。亲核物质 (nucleophile) 是有提供电子对的倾向的原子。通过从催化剂提供电子对给底物的催化反应称为亲核催化 (nucleophilic catalysis)，亲核物质是极有效的催化剂，它们可以促进简单酯类的水解，将酰基从一个化合物转移到另一化合物上。酶分子至少含有三类能起催化作用的亲核基团，即组氨酸的咪唑基，丝氨酸的—OH基，半胱氨酸的巯基。此外许多辅基也有亲核基团。



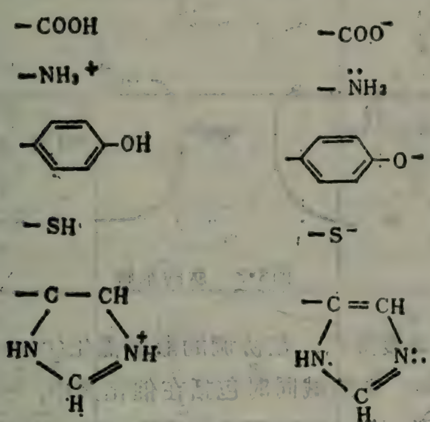
亲核催化可以下面的典型例子来说明，即咪唑基对酯类（乙酸对硝基苯酯）的水解作用。这个反应包括咪唑基攻击酯的羰基碳原子，同时置换出对硝基苯酚，然后用水分子水解乙酰咪唑中间物，产生乙酸并再生出催化剂来。



（3）酸碱催化。酸碱是有机反应中最常见的催化剂。酸碱催化主要有两类，即特异的酸碱催化（specific acid and base catalysis）和一般酸碱催化（general acid and base catalysis）。特异酸碱催化的催化剂为H^+（H_3^+O）或OH^-，它们作为质子供体

或质子受体。一般酸碱催化通常包括在酶反应中。细胞中存在的许多有机反应如羧基上加水，羧酸酯及磷酸酯的水解，从双键上失水，各种分子重排，以及许多置换反应等都属于一般酸碱催化。酶分子中含有许多功能团作为一般酸和一般碱，如氨基、羧基、巯基、酚羟基及咪唑基等。

蛋白质中的一般酸基（质子供体）　　蛋白质中的一般碱基（质子受体）



由于酶通常只在相当狭窄的pH范围（近于中性）内起作用，故特异的酸碱催化在酶反应中并不重要，在活性部位上H^+及OH^-浓度不可能显著增加，但是在酶的活性部位中存在着酸性的或碱性的氨基酸侧链，它们在中性pH附近可以当作质子供体或质子受体进行一般酸碱催化，下面以醛的水化及肽的水解为例说明一般的酸碱催化作用（图8·3）。

在一般酸碱催化反应中，催化剂充作质子供体或质子受体。通常质子的转移是转移到过渡态的碳原子上，当化学反应不在水（H_2O）中而在氘（D_2O）中进行时，酶反应速度即大大下降，这表明质子的转移是限速步骤，因为氘离子（D^+）比质子

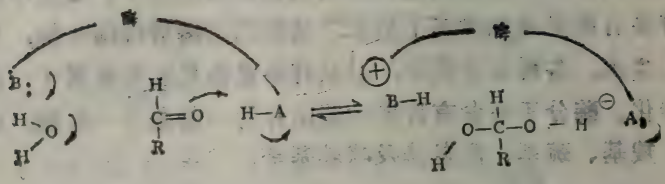


图8·2 醛类的水化

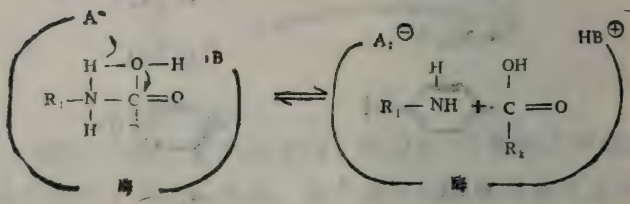


图8·3 肽的水解

(H^+)的转移要慢得多，在协调的酸碱催化(concerted acid and base catalysis)中酸碱同时包括在催化剂中，一般酸向过渡态分子供应质子，而一般碱则接受质子。图8·4是酯类水解时各种酸碱催化的反应。

有两个重要因素影响一般酸碱催化的反应速度：首先是一般酸碱的强度，即其质子的解离常数，在最活泼的一般酸碱催化剂中，组氨酸的咪唑基（p^k为6.0左右）既可作为质子供体又可作质子受体。第二个重要因子是酸碱供应或接受质子的速度。咪唑基在中性pH时供应质子和接受质子的速度非常高，其半衰期不到0.1微秒（ms）。在许多酶的催化部位中都含有组氨酸残基，这不是没有道理的，由于大多数酶蛋白中含有少量的组氨酸残基，这些组氨酸可能是生物进化过程中自然选择的结果，使之在酶的催化中起着特殊的作用。

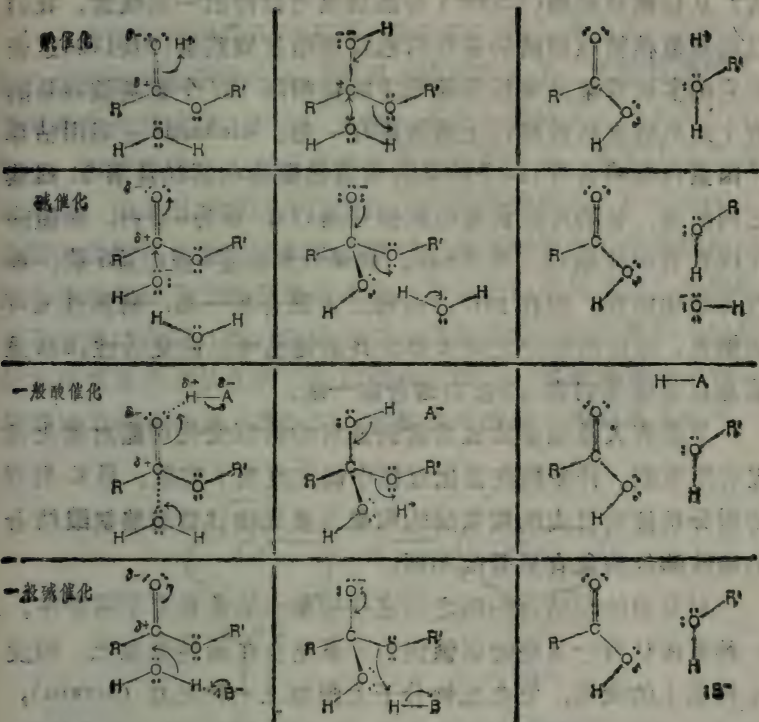


图8·4 各种酯类水解时的不同酸碱催化

一般酸碱催化提供了一个在中性pH（H^+及OH^-浓度极低）条件下进行催化的方法，否则化学反应需要很高的H^+或OH^-浓度才能进行。例如酶不存在时，肽链的水解就需要在极高的H^+或OH^-浓度下，长时间地进行反应以及高温才能完成，而用胰凝乳蛋白酶水解肽链时，在中性pH、常温下即能迅速进行反应，这就是在活性部位靠一般酸碱催化的缘故。

（4）诱导应力的催化。为什么酶分子必须有天然的三维构象才能进行催化呢？酶分子的结构与底物比较起来为什么那么

大？从核糖核酸酶(RNase) 等的研究可以得出一些线索。我们已经知道核糖核酸酶的催化活性需要组氨酸残基12及119，这表明它的多肽骨架必须折迭起来才能使相隔 107 个氨基酸残基的两个组氨酸在活性部位上紧紧靠在一起。Richards 证明用枯草杆菌蛋白酶将含有124个残基的核糖核酸酶在第20及第 21 残基之间断裂，长的片段含有组氨酸残基119，称为S蛋白，而短的片段含有组氨酸12，称为S肽。如果分别测定S蛋白及S 肽，都没有催化活性，但在 pH7.0时将二者混合在一起，酶活性又可以恢复，即使两部分之间未形成共价键也可以恢复活性。S肽显然是以氢键等弱键与S蛋白结合在一起。

早就有人设想多肽链紧紧折迭后的构象变化可能对催化反应有所贡献。许多酶在催化过程中确实改变了构象。用X-射线衍射分析证明自由的羧肽酶的构象与被底物甘氨酰酪氨酸结合的羧肽酶的构象有显著的不同。

对自由的与结合的酶之间这些构象上的差异有不同看法。一种看法认为一旦底物以锁钥的关系结合在活性部位上，即发生构象上的变化，它在底物分子上强加上一种应力 (strain)，使分子变形，这种观点的缺点是，如果活性部位具有刚性结构，象锁钥学说所说的那样，它不能既适合反应的底物又适合反应的产物。这个矛盾引起另一种假说，它认为自由酶的活性部位既不完全适合底物，也不完全适合产物，而只适合过渡态化合物。支持这个观点的证据是有些酶类被类似过渡态的化合物所抑制，而不被自由底物分子抑制。

Koshland(1958)提出的诱导契合学说(Induced fit theory)就是为了解释酶作用的异常现象。例如，许多种酶不能作用于其正常底物的较小的同系物上，这可以己糖激酶 (hexokinase)为例说明之。

$$ATP + D\text{-葡萄糖} \rightleftharpoons ADP + \text{葡萄糖-6-磷酸}$$

己糖激酶可以将几种不同的己糖的6-羟基磷酸化，因此可以设想它也应当能催化比己糖更小的底物分子。比葡萄糖较小的同系物有甘油醛、甘油、乙醇，甚至水的分子，由于其分子较小，而浓度较大，本应很容易透入活性部位，从ATP接受磷酸基团，但是己糖激酶不能使这些同系物磷酸化。Koshland认为酶的活性部位没有被彻底占据时，自由酶的分子的活性部位的必需功能团不能处于最合适的位置以进行催化反应。当底物分子与酶结合时，结合的亲合力会迫使酶分子改变构象，使催化基团采取合适的几何图象以形成过渡态，这就是诱导契合。按照诱导契合学说（图8·5），底物诱导酶分子构象发生变化，

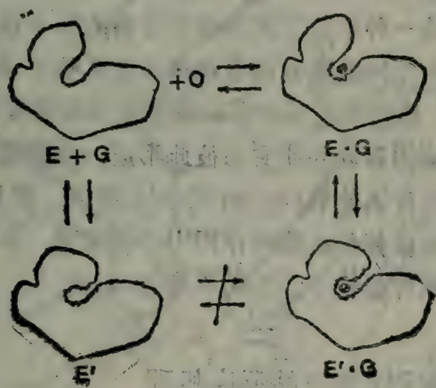


图8·5 酶的诱导契合学说示意图
（E代表己糖激酶，G代表葡萄糖）

使酶的催化基团获得所需的结构，使它们与底物紧密配合并相互作用，酶分子处于这样的活泼的构象时是不稳定的，一旦去掉底物它立即返回到自由的形式。一个不良的底物，即与活性部位亲合力很低的底物，不能迫使酶分子改变成最活泼的形式，

因为它的分子或则太小或则缺乏正确的立体结构。这就可以解释为什么水（浓度高达55M）不能在己糖激酶的反应中与正常底物葡萄糖相竞争。当底物分子被结合时，酶的诱导构象变化可能是加速反应速度的一个重要因素，大概它们扭曲酶和底物分子，使它们更容易进入过渡态。

总结上面讨论，酶分子如何表现其催化活性，首先是将底物分子聚集起来并在活性部位上结合，定向排列；其次，酶在适当的定向位置上提供酸碱基团，以促进底物分子内的质子转移；第三，酶分子内一些基团（特别是亲核基团）可以与底物相互作用形成共价的结构，这种结构比底物中原来存在的结构更容易反应；第四，酶可以诱导底物发生应变或变形，亦可能伴随着酶蛋白构象的变化。上述四种对酶的催化作用有贡献的因素，单独一种不能完满解释所有酶的整个催化活性，对每种酶很可能由不同的因素结合起来决定其整个反应速度。据Jencks计算，邻近效应及定向效应可使反应速度加快10^8倍，将底物与催化基团靠近并使它们彼此形成一定角度，以进行移动和转动，这样可以使熵(entropy)大大降低，容易达到过渡态。共价催化及酸碱催化在酶的作用中非常重要，但它们对增加反应速度的贡献可能较小，大约不超过10^3倍。

五、酶活性部位的反应机理

目前还没有一种酶的作用机理的细节被完全弄清楚，不过在这方面从动力学及专一性的研究，酶活性部位的化学分析以及比较一些酶及其与底物或竞争性抑制剂的复合物的X-光衍射分析的结果已经取得了很大的进展。有许多种酶的作用机理开始可以阐明，下面我们举几个例子加以说明。

（1）胰凝乳蛋白酶。胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin）是研究得最深入的一种酶。胰凝乳蛋白酶原的一级结构由245个氨基酸残基组成，含有5对二硫键。胰凝乳蛋白酶由三条肽链组成，分别命名为A、B、C，三条肽键由二对二硫键连在一起，另三对二硫键在B、C链上形成三个圈（loops）。胰凝乳蛋白酶的立体结构已用X–光衍射分析达到2Å分辨率的水平）图8·6）。在上面已经讲到，在其活性部位上有组氨酸57及丝氨酸195残基，彼此相互邻近，底物肽可以与胰凝乳蛋白酶形成一个共价键的酰基酶的中间产物，其中包含丝氨酸195的羟基，这些资料可以描

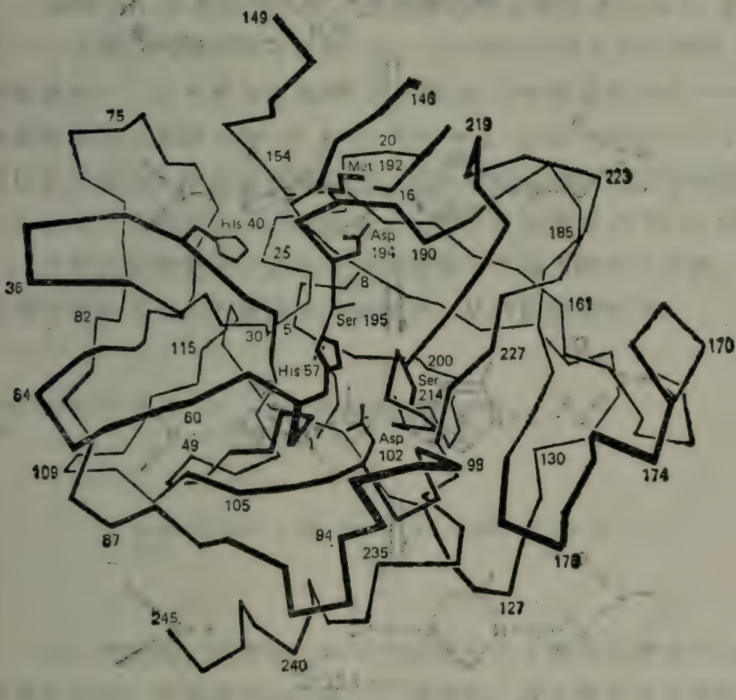


图8·6　胰凝乳蛋白酶的三维结构

绘出一个胰凝乳蛋白酶的反应机理，如图8·7。

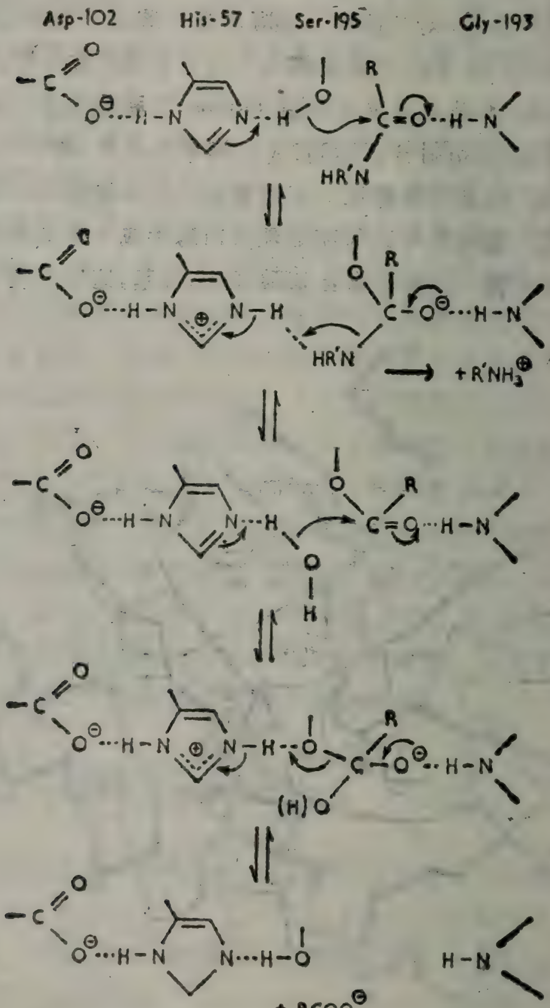
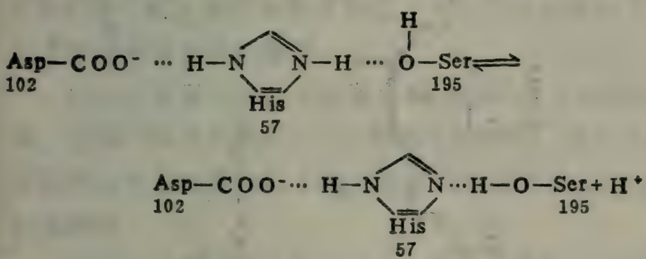


图8·7　胰凝乳蛋白酶的作用机理

在自由的胰凝乳蛋白酶上丝氨酸195的羟基与组氨酸57的咪唑基的N之间形成氢键。反应时丝氨酸195上的质子迅速转移到组氨酸57的咪唑N上。瞬间在咪唑基与底物之间形成氢键，这时底物的羧基碳原子受到丝氨酸氧原子亲核基团的攻击，取代另一氨基酸(R_1COOH)的氨基，形成丝氨酸195的氨酰基衍生物，剩下的基团即底物的C末端氨基酸。然后组氨酸57的咪唑基促使酶从丝氨酸195的羟基转移氨基酸给一个酰基受体，在一般情况下水作为受体，形成氨基酸(RCOOH)，于是自由的酶又再生出来。

Blow用X-光衍射技术发现在胰凝乳蛋白酶的催化部位含有一个埋藏在内部的天冬氨酸102，它以氢键与组氨酸57连接，而组氨酸57又以氢键与丝氨酸195连接，这三个氨基酸组成一个电荷传递继电系统(charge relay system)，在这个系统中质子可以从丝氨酸195转移到咪唑基，又从咪唑基转移到天冬氨酸102，它可以将埋藏在内部的羧基上的质子转移到表面的基团上，这样丝氨酸侧链上的氧原子就变成一个强烈的亲核物质，它可以攻击底物上的羰基上的碳原子，从而使肽键断开。



(2) 溶菌酶。溶菌酶(lysozyme)是另一个催化机理研究得较清楚的酶。溶菌酶在动植物中广泛存在，并大量存在于鸡蛋清中。它的一级结构由129个氨基酸残基组成，从X-光衍射分

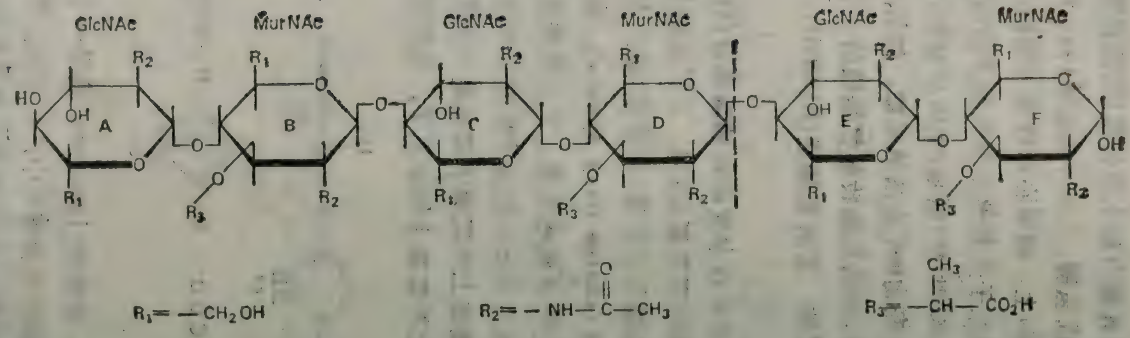


图8·8　溶菌酶底物中六个糖残基的结构

（在……处底物被酶水解）

析结果可以看出溶菌酶的结构很象一只小鸟，在它的两翼（即两个结构域）中间有一个长的裂缝，底物在这里与之结合，裂缝可容纳6个葡糖胺残基（图8·8），溶菌酶的底物是细菌细胞壁的长链的肽聚糖。

溶菌酶能与正常底物结构相似的一些迟钝的底物结合形成酶底物复合物，这些底物在酶分子的裂缝上结合，但不被酶攻击。有一种溶菌酶的酶·底物复合物已经结晶出来，而且用X-光衍射法分析了它的结构，从活性部位的结构可以清楚地看到。图8·9为酶与结合的六糖的氨基酸残基，糖苷键被水解的部分位于D与E之间，活性部位的催化基团为天冬氨酸52及谷氨酸35残基上的羧基，它们靠近被打断的糖苷键附近，这些羧基在协调的一般酸碱催化机理中作为质子供体和质子受体，这些基团被非极性基团包围，因而促进了质子的转移。

图8·9为溶菌酶作用的可能的机理。D环为N-乙酰胞壁酸残基，E环为N-乙酰葡糖胺残基。谷氨酸35的氢原子攻击两个糖残基之间的糖苷的氧原子。D环的碳原子1变成一个正碳离子（carbonium ion），并由邻近的天冬氨酸52的COO^-基团所平衡，这时D环发生扭曲变成半椅式构型。水分子的氢氧离子攻击正碳离子即完成糖苷键的断裂。

（3）木瓜蛋白酶。木瓜蛋白酶（papain）是植物的蛋白水解酶，它的一级结构由212个氨基酸残基组成。动力学研究表明，半胱氨酸残基25能与被水解的肽键或酯键的羧基反应形成中间的硫酯键。

木瓜蛋白酶-SH + RCOX⟶木瓜蛋白酶-S-COR + HXX-光衍射研究证明木瓜蛋白酶的催化部位含有半胱氨酸25、组氨酸159及天冬酰胺175。半胱氨酸25与组氨酸159之间的距离很近，足以形成氢键，组氨酸的咪唑基团并与天冬酰胺175形成

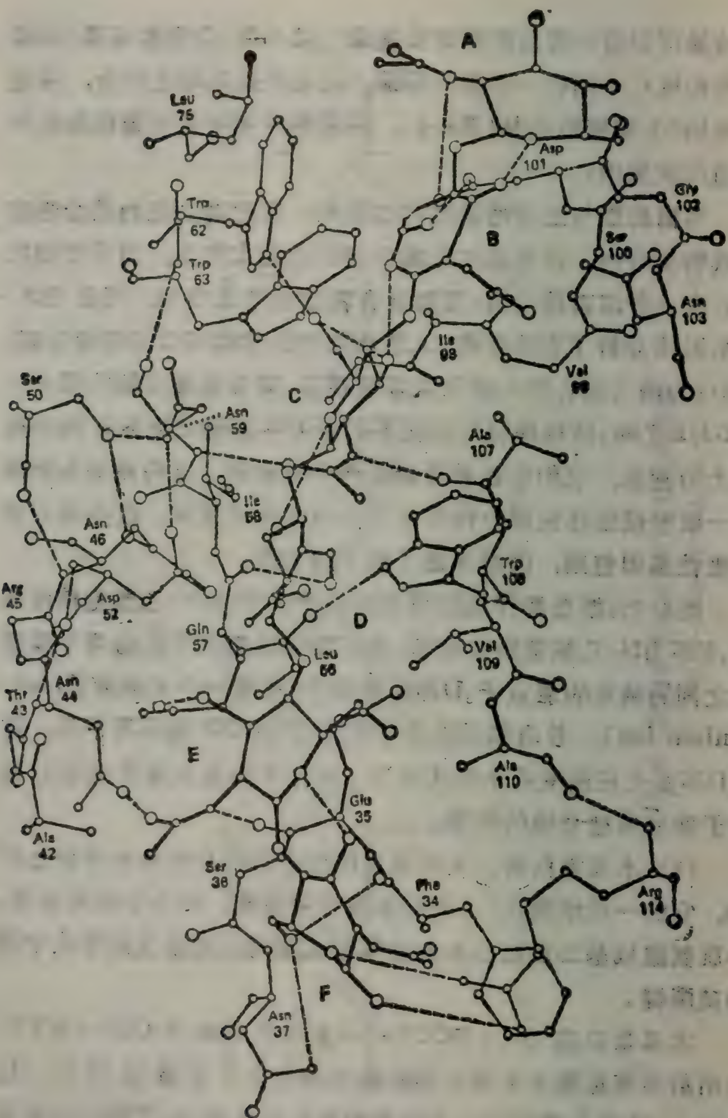


图8·9　底物(六糖)与溶菌酶活性部位结合的图解
(每个亚部位subsite与一个糖分子相结合)

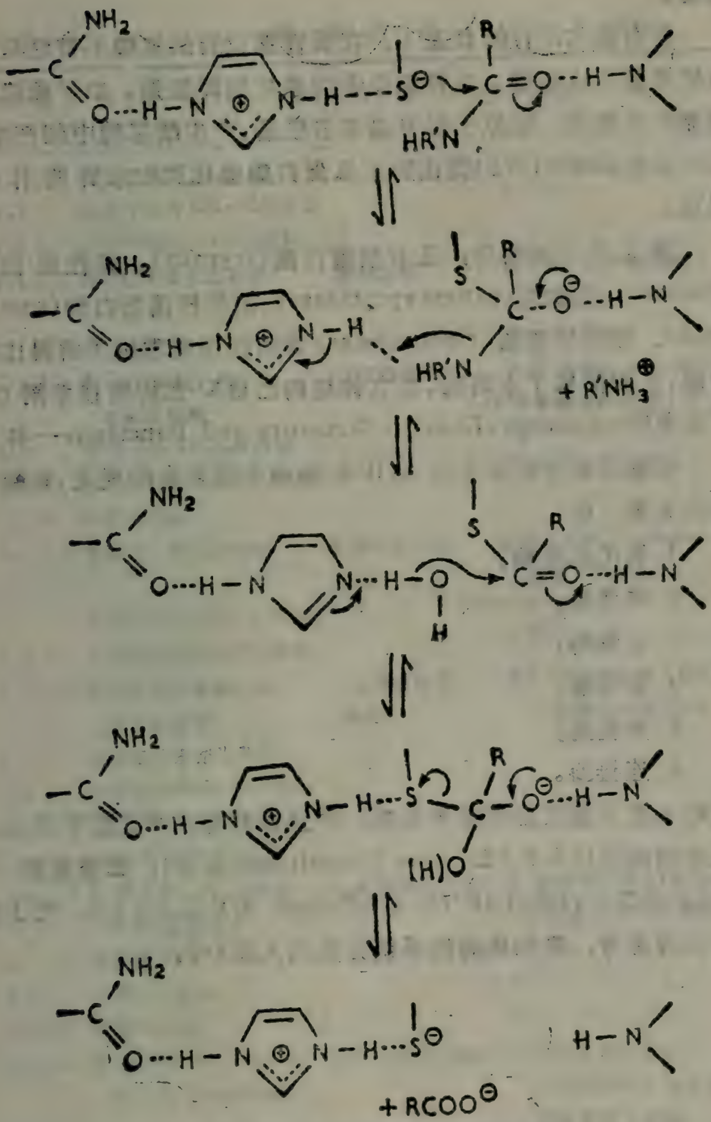


图8·10　木瓜蛋白酶的作用机理

氢键。

在有催化活性的状态下，在活性部位的组氨酸不带电荷并与硫氢基形成氢键。这样硫原子的亲核性即加强。由于硫原子增加的亲核性，硫原子很容易攻击酰基，产生酰基酶中间产物。图8·10是Lowe(1970)提出的木瓜蛋白酶催化肽的水解的作用机理。

除上述三种酶外，还有胰蛋白酶(trypsin)、弹性蛋白酶(elastase)、羧肽酶(carboxypeptidase)、枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)、核糖核酸酶(ribonuclease)等的作用机理也了解得比较清楚，它们都属于水解酶，其立体结构已用X-光衍射技术阐明，可参考Blackburn的《Enzyme Structure and Function》一书。

根据国际生物化学协会(IUB)酶命名委员会的规定，将酶分为六大类，即

1. 氧化还原酶；
2. 转移酶；
3. 水解酶；
4. 裂解酶；
5. 异构酶；
6. 连接酶。

在每大类下面又分为若干亚类，并且每种酶以四位数字表示，通常前面冠以E.C.(Enzyme Committee的简称)，如酪氨酰-tRNA合成酶(tyrosyl-tRNA synthetase)为E.C.6.1.1.1。为了便于读者参考，我们将酶的系统分类列入表8·2。

表8·2 酶的分类

编号	系统名称	普通名称	反应
1.	氧化还原酶		
1.1	作用于供体CH—OH基团		
1.1.1	以NAD或NADP为受体		
1.1.1.1	醇:NAD氧化还原酶	醇脱氢酶	醇+NAD⇌醛(或酮)+NADH
1.1.3	以O_2为受体		
1.1.3.4	β-D-葡萄糖：氧氧化还原酶	葡萄糖氧化酶	β-D-葡萄糖+O_2⇌D-葡萄糖酸δ-内酯+H_2O_2
1.2	作用于供体醛基或酮基		
1.2.1	以NAD或NADP为受体		
1.2.3	以氧为受体		
1.2.3.2	黄嘌呤：氧化还原酶	黄嘌呤氧化酶	黄嘌呤+H_2O+O_2⇌尿酸+H_2O_2
1.3	作用于供体CH—CH基团		
1.3.1	以NAD或NADP为受体		
1.3.1.1	4,5-二氢尿嘧啶：氧氧化还原酶	二氢尿嘧啶脱氢酶	4,5-二氢尿嘧啶+NAD^+⇌尿嘧啶+NADH
1.3.2	以细胞色素作为受体		
1.4	作用于供体的$CH—NH_2$基团		
1.4.3	以O_2为受体		
1.4.3.2	L-氨基酸：氧 氧化还原酶(脱氨基)	L-氨基酸氧化酶	L-氨基酸+H_2O+O_2⇌2-酮酸+NH_3+H_2O_2
2.	转移酶		
2.1	转移C-1基团		
2.1.1	甲基转移酶		
2.1.1.2	S-腺嘌呤甲硫氨酸：胍基乙酸 N-转甲基酶	胍基乙酸转甲基酶	S-腺嘌呤甲硫氨酸+胍基乙酸⇌S-腺嘌呤高半胱氨酸+肌酸

续表1

编号	系统名称	普通名称	反应
2.1.2	羟甲基转移酶及羟甲酰基转移酶		
2.1.2.1	L-丝氨酸：四氢叶酸 5,10-羟甲基转移酶	丝氨酸羟甲基转移酶	L-丝氨酸+四氢叶酸⇌甘氨酸+5,10-亚甲四氢叶酸
2.1.3	羧基转移酶及氨甲酰基转移酶		
2.2	转移醛基或酮基		
2.3	酰基转移酶		
2.4	葡糖基转移酶		
2.6	转移含N基团		
2.6.1	氨基转移酶		
2.6.1.1	L-天冬氨酸：2-酮戊二酸 氨基转移酶	天冬氨酸氨基转移酶	L-天冬氨酸+2-酮戊二酸⇌草酰乙酸+L-谷氨酸
2.7	转移含P基团		
2.8	转移含S基团		
3.	水解酶		
3.1	裂解酯键		
3.1.1	羧酸酯水解酶		
3.1.1.7	乙酰胆碱乙酰水解酶	乙酰胆碱酯酶	乙酰胆碱+H_2O⇌胆碱+乙酸
3.1.3	磷酸单酯水解酶		
3.1.3.9	D-葡糖-6-磷酸磷酸水解酶	葡糖-6-磷酸酯酶	D-葡糖-6-磷酸+H_2O⇌D-葡糖+H_3PO_4
3.1.4	磷酸二酯水解酶		
3.1.4.1	正磷酸二酯磷酸水解酶	磷酸二酯酶	磷酸二酯+H_2O⇌磷酸单酯+醇
4.	裂解酶		
4.1	C-C裂解酶		

续表2

编号	系统名称	普通名称	反应
4.1.1	羧基裂解酶		
4.1.1.1	2-酮酸羧基裂解酶	丙酮酸脱羧酶	2-酮酸⇌醛＋CO_2
4.1.2	醛基裂解酶		
4.1.2.7	1-磷酸酮糖醛基裂解酶	醛缩酶	1-磷酸酮糖⇌磷酸二羟丙酮＋醛
4.2	C-O裂解酶		
4.2.1	水裂解酶		
4.3	C-N裂解酶		
4.3.1	氨裂解酶		
4.3.1.3	L-组氨酸氨-裂解酶	组氨酸脱氨酶	L-组氨酸⇌尿酸＋NH_3
5.	异构酶		
5.1	消旋酶及表异构酶		
5.1.3	作用于碳水化合物		
5.1.3.1	5-磷酸-D核酮糖3-表异构酶	磷酸核酮糖表异构酶	5-磷酸-D-核酮糖⇌5-磷酸木酮糖
5.2	顺-反异构酶		
5.3	分子内氧化还原酶		
5.3.1	醛糖及酮糖互相转换		
5.4	分子内转移酶		
6.	连接酶		
6.1	形成C—O键		
6.1.1	氨基酸-RNA连接酶		
6.1.1.1	L-酪氨酸：tRNA连接酶（AMP）	酪氨酰-tRNA合成酶	ATP＋L-酪氨酸＋tRNA⇌AMP＋焦磷酸＋L-酪氨酰-tRNA
6.2	形成C-S键		
6.3	形成C-N键		
6.3.1	酸-氨连接酶		
6.3.2	酸-氨基酸连接酶		

续表3

编号	系统名称	普通名称	反应
6.4	形成C-C键		
6.4.1	羧化酶		
6.4.1.2	乙酰辅酶A：二氧化碳连接酶（ADP）	乙酰-CoA羧化酶	ATP＋乙酰辅酶A＋CO_2＋H_2O ⇌ ADP＋正磷酸＋丙二酰-CoA

参考文献

1. Bornhard, S.: The Structure and Function of Enzyme, Benjamin, 1969.
2. Wharton, C. W. & Eisenthal, R.: Molecular Enzymology, Blackie, 1981.
3. Blackburn, S.: Enzyme Structure and Function, Marcel Dekker, 1976.
4. Ferdinand, W., 王志美等译：酶分子，科学出版社，1976.
5. 许根俊：酶的作用原理，科学出版社，1984.

第九章　收缩蛋白与运动

一、引言

运动(motility)是生活细胞最基本的特性，它表现为各种不同的方式，最明显的是脊椎动物的肌肉收缩(muscle contraction)，包括骨骼肌、平滑肌和心肌的收缩。除此之外，几乎所有细胞中都有各种运动，如吞噬作用(phagocytosis)、细胞质流动(cytoplasmic streaming)，变形虫运动(amoeboid movement)、胞质分裂(cytokinesis)及有丝分裂(mitosis)等，肌肉收缩可以认为是一种最完善的细胞运动。

肌肉收缩是靠肌肉中的收缩蛋白(contractile proteins)完成的，肌肉的收缩蛋白主要是肌球蛋白(myosin)和肌动蛋白(actin)，肌肉收缩就是由于肌球蛋白和肌动蛋白的相互运动。另外还有起调节作用的原肌球蛋白(tropomyosin)、肌钙蛋白(troponin)。其它非肌细胞的运动也是靠肌球蛋白和肌动蛋白的相互作用。细胞纤毛运动和鞭毛运动则是由于另外两种蛋白质，即微管蛋白(tubulin)和力蛋白(dynein)的相互作用。

ATP的化学能转变成肌肉收缩和细胞运动所需要的机械能是当前生物化学及分子生物学中的最重要问题之一。原因之一是迄今我们还没有一个这样的能量转换模型，例如，还没有人

造的机器能够直接将化学能转变为机械能。肌肉和运动细胞是效率极高的能量转换器。这个问题应从生物化学、生物物理学等各方面进行深入的探讨，才能彻底弄清楚。

二、肌肉收缩与肌肉蛋白

1.肌肉的细微结构

对脊椎动物的肌肉收缩研究得最为清楚，特别是它们的横纹肌(striated muscle)或骨骼肌(skeletal muscle)。骨骼肌的细胞很长，而且含有很多的细胞核，细胞外面有一层质膜称为肌纤膜(sarcolemma)。肌肉细胞的大部分是肌原纤维(myofihrile)。这些肌原纤维按照肌肉收缩的方向平行地排列成束。

每个肌原纤维含有许多肌纤丝(mgofilaments)。肌原纤维埋藏在肌浆(sarcoplasm)之中。肌浆中含有糖原、糖酵解的酶类及其各种中间产物，ATP、ADP、AMP、磷酸、肌酸(creatine)、磷酸肌酸(creatine phosphate)和无机电解质以及一些氨基酸、肽等。

肌原纤维由许多肌小节(sarcomere)组成，长约2.5μm，它们是肌原纤维的收缩单位。在骨骼肌中肌小节呈横纹状，故称横纹肌。在显微镜下观察，亮带与暗带相互交替。亮带也称为各向同性带（isotropic band或I band），暗带称为各向异性带(anisotropic band或A band)。各向同性的结构不管测量的方向如何，都具有一致的物理性质，而各向异性的结构，其物理性质则随测量的方向改变。肌肉的A带在光学上各向异性，其折射率在各方向不一致，产生双折射（birefringence)。一般来说，双折射是由在一个方向上不对称的分子的固体所表现出来的。

Huxley与Hanson用电子显微镜观察肌原纤维，发现其中含有两类肌纤丝，一种是粗纤丝(thick filament)，另一种是细纤丝(thin filament)。在横纹肌的I带中只有细纤丝存在，其直径为6nm。在A带中除含有细纤丝外，还含有粗纤丝，其直径为15—17nm。故A带具有双折射特性。肌肉的横切面表明，粗纤丝按六角形排列，距离各为45nm，每六个粗纤丝又由6个细纤丝包围，也呈六角形(图9·1)。

粗纤丝贯穿A带，从A带的一端达到另一端，而细纤丝在A带中并不贯穿。细纤丝由Z线(Z line)开始，穿过I带，一部分

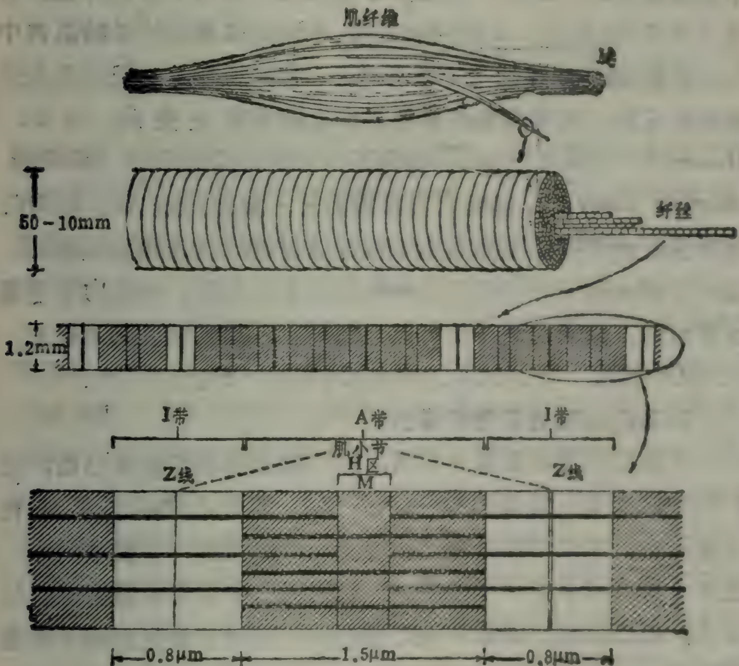


图9·1 横纹肌的结构

伸入到A带中，但它在A带的H区(H zone)部分即行中止。H区为A带的中央部分，长约20.5μm，颜色稍淡，它的中央为M线(M line)。肌小节的长度就是从一个Z线到相邻的另一Z线为止。

在A带的深色部分，从粗纤丝到细纤丝之间有一些规则的突起，用高倍电子显微镜可以看到，这些突起构成横桥(cross bridge)。在骨骼肌中每隔43nm有6个横桥，它们成对排列，相隔120°。

2.肌肉收缩的变化

肌小节是肌原纤维的收缩单位。肌小节最大收缩时可以使肌纤维缩短20—25%。当肌肉被拉长时，肌小节可以伸长到其静止长度的120%。从舒张的肌肉、收缩的肌肉和拉长的肌肉中的A带和I带的测量结果可以看出，A带即粗纤丝的长度是永远保持恒定的。同样地细纤丝的长度也没有发生变化。因此，Huxley与Hanson（1969）提出了一个纤丝滑动学说（sliding filament theory），解释肌肉收缩的分子机理。他们认为肌肉收缩时肌纤丝长度的改变是由于粗纤丝与细纤丝彼此互相滑动，细纤丝伸入到粗纤丝区带之中的程度发生变化。当肌肉发生最大收缩时，两端的细纤丝可以互相接触，甚至可以交叉起来，在H区中形成一个新的浓的中央区带(图9·2)。

3.肌肉细胞的蛋白质成分

骨骼肌的蛋白质成分包括：（1）肌浆的水溶性蛋白质，它们构成肌肉蛋白总量的20—25%；（2）肌纤维中的水不溶性纤维蛋白。肌浆中的蛋白质很容易用冷水从肌肉中提取出来，这部分称为肌浆蛋白(myogen)。肌浆蛋白中含有大量糖酵解的酶类，如醛缩酶、磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油脱氢酶及磷酸化酶等。

肌纤丝的不溶性蛋白比较难于分离提纯，本世纪30年代

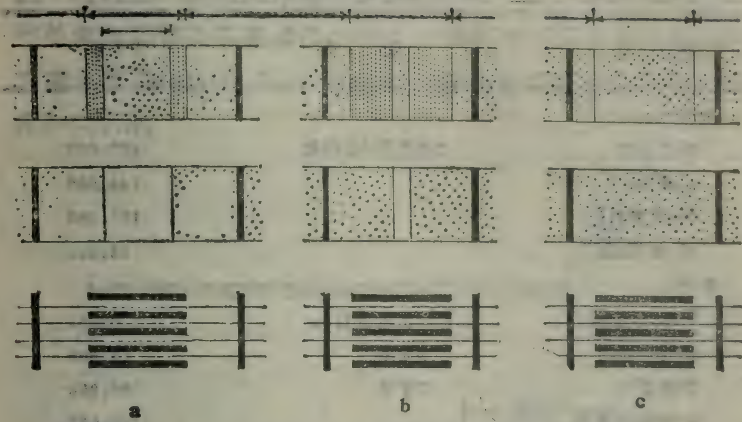


图9·2　肌肉收缩时I带和A带的变化
(a)舒张时　(b)收缩时　(c)过度收缩时

Edsall等人先用冷水提取研碎的兔肌肉，去掉肌浆蛋白之后，将不溶解的蛋白用0.6MKCl提取使之溶解，然后稀释或透析使之沉淀。这部分不溶于水而溶于0.6MKCl的蛋白质称为肌球蛋白(myosin)。

Engelhardt及Lyubimova于1939年发现肌球蛋白具有ATP酶的活性，在有Ca^{++}离子存在时，肌球蛋白能水解ATP的末端磷酸基团，产生ADP及无机磷酸。后来Szent-Gyorgyi将肌球蛋白的0.6M KCl溶液用一注射针头注射到冷的蒸馏水中，肌球蛋白即沉淀成丝状。当将ATP及Ca^{++}离子加到丝状的肌球蛋白中，其长度即发生显著缩短，同时ATP即被水解。

二次大战期间，Szent-Gyorgyi及Straub发现肌肉中含有另一类主要的蛋白质成分，他们称之为肌动蛋白(actin)。

肌肉蛋白除去其主要成分——肌球蛋白及肌动蛋白以外，还含有一些其它蛋白质，如表9·1所示。

表9·1　　兔肌纤丝的蛋白质成分

定　位	亚　基	分子量
粗纤丝：		
肌球蛋白	2条重链4条轻链	460,000
C蛋白		140,000
M-线蛋白I		155,000
M-线蛋白II		88,000
细纤丝：		
F-肌动蛋白	(G-肌动蛋白)n	(42,000)n
原肌球蛋白	2亚基	70,000
肌钙蛋白	3亚基	80,000
α-辅肌动蛋白		100,000
β-辅肌动蛋白		70,000

三、肌球蛋白

粗肌纤丝的主要成分为肌球蛋白，可以用0.6MKCl使之溶解，然后稀释或者透析，使之沉淀出来，反复多次就可以得到纯的肌球蛋白。

用高度纯化的肌球蛋白进行测定，其分子量为460,000道尔顿，它是一个长形的不对称分子，长约160nm。肌球蛋白分子具有两个球状的头部和一个长的尾部，用电子显微镜可以观察清楚(Lowey，1967)。肌球蛋白含有两条完全相同的长肽链和4条短肽链。长肽链的分子量为200,000道尔顿，称为重链(heavy chain)，短链称为轻链(light chain)。用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳证明这4条轻链分别为A_1链(分子量＝25,000)，A_2链(分子量＝16,000)及两条DTNB链(分子量＝18,000)。将肌球蛋白用5,5′-二硫双(α-硝基苯甲酸)（简称DTNB)处理后放出

的一种轻链，约占肌球蛋白轻链的一半，称之为DTNB 轻 链。另外两条轻链只有在碱性(pH11.4)条件下可以分离出 来，故称为碱性轻链(alkali light chains)，整个肌球蛋白分子的结构如图9·3所示。

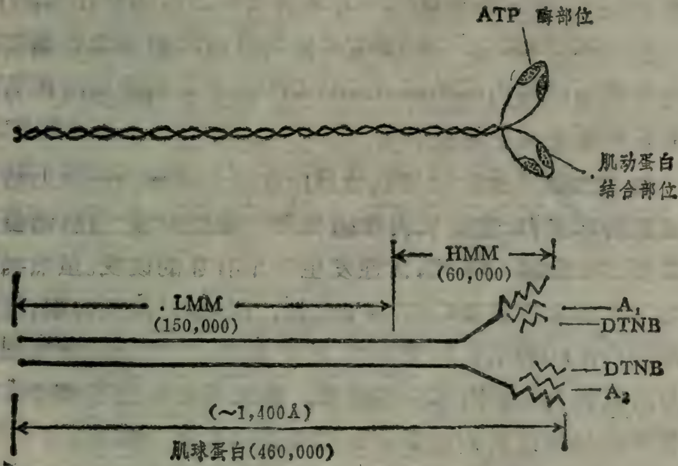


图9·3 肌球蛋白的结构

肌球蛋白的两条重链可以用浓脲或胍溶液处理使之分开，它是迄今所知肽链最长的分子，每条肽链含有1800个氨基酸残基，它的氨基酸顺序尚未测出。骨骼肌的球蛋白含有稀有的氨基酸，即3-甲基组氨酸，ε-N-甲基赖氨酸和ε-N-三 甲基 赖氨酸，位于肌球蛋白的头部之中，可能起着特殊的作用。

在肌球蛋白分子的大部分长度中，每条重链都具有α螺旋构象，并且两条链彼此缠绕在一起，重链的一部分折迭成球状结构，形成头部。如果用胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶处理肌球蛋白，在尾部靠近中间部分，可使肽链断裂，产生两部分，一部分称为重酶解肌球蛋白(heavy meromyosin, HMM)，另一 部分称

为轻酶解肌球蛋白(light meromyosin, LMM)。如用木瓜蛋白酶处理即从头部产生两个S_1碎片及一个尾部。

肌球蛋白具有ATP酶的活性，它可以水解ATP的末端磷酸基团，同时也能水解GTP、CTP等。ATP酶在Mg^{++}存在时活性很低，但在K^+及EDTA或Ca^{++}存在时活性可以增加10倍以上。骨骼肌肌球蛋白的Mg^{++}-ATP酶活性可以被F-肌动蛋白激活，就是这个肌动球蛋白(actomyosin)ATP酶在肌肉收缩时作为将化学能转变成机械功的复合物。

纯化的肌球蛋白能与肌动蛋白在两个特异的部位上结合，形成肌动球蛋白，这是肌肉收缩机理的重要步骤。当肌动蛋白与肌球蛋白结合时，ATP酶活性发生一个有趣的改变。虽然纯肌球蛋白ATP酶活性需要Ca^{++}离子激活，受Mg^{++}离子抑制，但是肌动球蛋白ATP酶活性则受Mg^{++}离子激活。现在已经证明肌动蛋白与肌球蛋白头部S_1部分相结合，肌球蛋白头部有两个ATP酶催化部位，靠近它们有两个与肌动蛋白的结合部位。

由于Huxley的电镜研究并由于肌球蛋白的物理化学研究，现在我们对骨骼肌A带中的粗丝的分子结构已经有了详细的了解。每条粗纤丝长约1500nm，粗10nm，它是由一束肌球蛋白分子平行排列组成的，每个肌球蛋白分子约为160nm长。肌球蛋白分子定向排列成粗丝，其头部分别定位于粗纤丝的两端。头部从束中伸出来以规则的螺旋方式排列，每隔43.0nm有6个横桥(cross bridges)，构成一轮或一个重复单位。

在粗纤丝上除含有肌球蛋白之外，还含有另外两种蛋白，一种是C-蛋白，分子量为140,000，占粗纤丝总蛋白的3.5%，另一种是M线蛋白，它在M线上将肌球蛋白分子束缚在一起。

四、肌动蛋白

肌动蛋白存在有两种分子形式:(1)球状肌动蛋白(G-actin)及纤维状肌动蛋白(F-actin),即G-肌动蛋白的多聚体。单体的肌动蛋白在蒸馏水中稳定,但在一定条件下(如在0.MKCl中)即聚合成F-肌动蛋白。F-肌动蛋白为双股螺旋。

兔骨骼肌的G-肌动蛋白已经高度纯化,它的分子量为2,000道尔顿,分子为球形,由一条肽链组成,含有347个氨基酸残基。Collins等(1975)已经测定出它的氨基酸顺序,准确的分子量为41,785道尔顿。

Suck等(1981)用X-射线衍射技术测定了肌动蛋白的三维结构,达到了6Å分辨率的水平。肌动蛋白分子为长球形67×40×37Å,由一大结构域及一小结构域组成,每个结构域的中心为β-折迭片;周围由α-螺旋包围着,ATP结合在两个结构域的裂隙之间。

当G-肌动蛋白单体分散在水中或稀盐溶液中时,ATP与肌动蛋白单体结合。当加入中性盐(如0.1*M* KCl)时,G-肌动蛋白单体就聚合成F-肌动蛋白,同时释放出无机磷。每聚合1克分子的肌动蛋白单体,即裂解1克分子的ATP。

在ATP存在的情况下,G-肌动蛋白⇌F-肌动蛋白,这个反应是可逆的,可以反复进行。肌

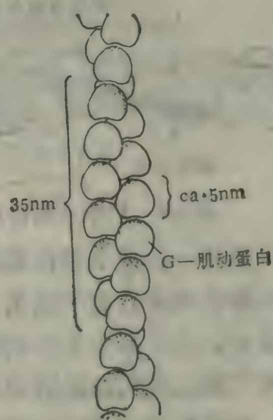


图9·4 F-肌动蛋白

动蛋白聚合成纤维状肌动蛋白以后，它的粗度即大大增加。

肌动蛋白聚合物的F-肌动蛋白(图9·4)，是长的双股螺旋，即两股由G-肌动蛋白聚合的丝彼此缠绕在一起，形成直径60—80Å(6—8nm)的双股螺旋，沿螺旋长轴的螺距(pitch)为365Å。

在肌动蛋白组成的细丝上还存在两种主要的辅助蛋白，它们的功能是调节控制粗丝与细丝之间小横桥的形成和断开，以及机械力的产生。首先是原肌球蛋白(tropomyosin)，它占肌肉蛋白总量的10—11%。1948年由Baily分离纯化得到结晶。兔肌的原肌动球蛋白分子量为70,000，由两条α-螺旋的多肽链组成，分子量分别为33,000及37,000，两条肽链缠绕40nm长的螺旋，它的大部分氨基酸顺序已经测定清楚。

原肌球蛋白的长而细的分子尾对尾地排列在F-肌动蛋白螺旋纤丝的线沟之中(图9·5)。每个原肌球蛋白分子只与一条F-肌动蛋白微丝相接触。每个原肌球蛋白分子覆盖着7个G-肌动蛋白分子。

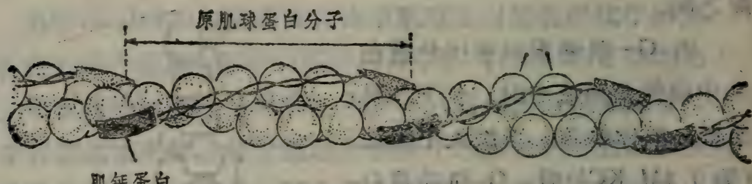


图9·5 F-肌动蛋白及其上的原肌球蛋白和肌钙蛋白

另外一种调节蛋白称为肌钙蛋白(troponin)。如果将肌动蛋白和肌球蛋白高度纯化，则肌动球蛋白对Ca^{++}的敏感性就要丧失。纯化所失去的就是肌钙蛋白和原肌球蛋白。在肌动球蛋白中加入纯化的肌钙蛋白和原肌球蛋白以后又可发生收缩现象，即产生超沉淀(superprecipitation)。

肌动球蛋白＋原肌球蛋白＋肌钙蛋白＋ATP＋Ca^{++} ⟶

超沉淀。

肌钙蛋白(troponin)，是日本生物化学家 Ebashi 于1965年发现的，它由三种多肽亚基组成：(1)与Ca^{++}结合的亚基，简称TN-C，分子量为18,000，每个TN-C与两个Ca^{++}结合，同时TN-C分子改变其构象；(2)抑制亚基，简称TN-I，分子量22,000，它与G-肌动蛋白有一结合部位，而不与Ca^{++}结合，抑制肌动蛋白头部的横桥相互作用；(3)与原肌球蛋白结合的亚基，简称TN-T，分子量为37,000。整个肌钙蛋白包括TN-C，TN-I 及TN-T三个亚基，分子外形为球状。肌肉收缩是受肌浆中的Ca^{++}离子调节的，Ca^{++}离子通过肌钙蛋白在肌肉收缩中起作用，我们可以从图9·5及图9·6来理解。

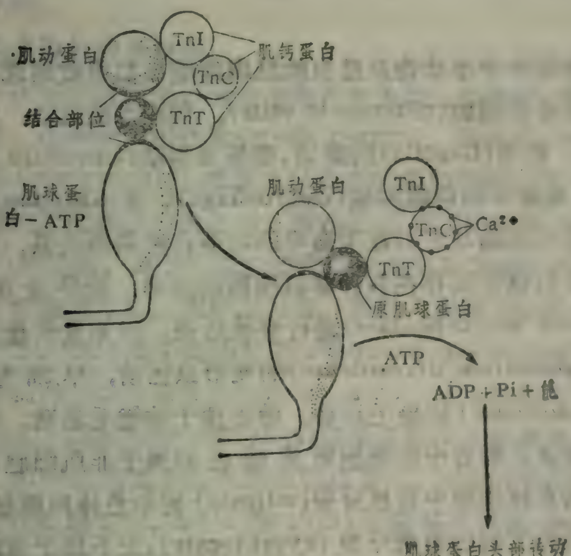


图9·6 肌肉收缩的机理
(Ca^{++}起调节作用)

当肌肉舒张时，肌球蛋白的头部与肌动蛋白不接触，中间由原肌球蛋白隔开，肌小节呈静止状态(如图9·6的左面所示)。当动物受到刺激时，从肌浆中释放出Ca^{++}离子，Ca^{++}离子与肌钙蛋白的TnC亚基结合，发生构象变化，即将原肌球蛋白从肌动蛋白与肌球蛋白头部之间拉出来(如图9·6中间所示)。肌球蛋白头部与肌动蛋白结合部位接触后，就使肌球蛋白头部发生转动，将由肌动蛋白组成的细丝向肌小节中心滑动，于是肌肉即发生收缩现象，使肌小节缩短。

五、非肌细胞的运动

动物界除脊椎动物及昆虫的肌肉细胞靠肌肉收缩进行运动外，其余非肌细胞(nonmuscle cells)，有些也能运动，如纤毛(cillia)、鞭毛(flagella)的颤动，变形虫运动(amveboid movement)，血液中的巨噬细胞(macrophage)、血小板(platelet)的运动。这些运动与它们在生命中的功能有密切的关系。在微生物和植物界也发现存在各种非肌细胞的运动。最早发现粘菌(*Physarum polycephalum*)进行穿梭运动，后来发现盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)的变形虫运动，单细胞衣藻(*chlamydomonas*)的鞭毛运动，游走精子的鞭毛运动，很多种植物细胞及花粉管中的细胞质流动也都属于非肌细胞运动。甚至一切真核细胞中有丝分裂(mitcsis)时染色体向两极运动，细胞一分为二时的胞质分裂(cytokinesis)，无不属于运动的范畴。因此运动是生命中最基本的特征，运动一旦停止，生命也就终止。非肌细胞虽然没有骨骼肌的复杂结构，但是二者运动

的机理是相同的，它们之中都存在收缩蛋白(肌球蛋白、肌动蛋白、微管蛋白及力蛋白等)，将ATP中的化学能转换成机械功，作为运动的动力。因此，研究肌肉蛋白及非肌细胞及其运动机理在生物医学中占有重要地位，相信这些研究今后在农牧业中也会起重要作用。细胞运动的研究也是分子生物学和细胞生物学中极其重要的内容。

六、非肌细胞的运动蛋白

现在非肌细胞中有两类细胞运动结构，即微丝(microfilament)和微管(microtubule)，组成它们的蛋白质也不同，现分别予以介绍。

1. 构成微丝的蛋白质

许多动植物的细胞运动是由微丝担负的。如粘菌、血小板、巨噬细胞、小肠壁的刷状缘(brush border)、车轴藻(*nitella*)及鸭跖草(*tradescantia*)雄蕊毛以及花粉管的细胞质流动，胞质分裂等均属微丝担负的运动。微丝是纤维状的肌动蛋白(F-actin)所组成。由于F-肌动蛋白及肌球蛋白的相互作用，于是产生了细胞质流动，变形虫运动，胞质分裂等运动现象。

Loewy(1952)最早证明粘菌(*Physarum polycephalum*)中存在类似肌肉的肌动球蛋白(actomyosin)，并且加ATP后会引起粘度变化，以后Hatano等(1966)证明其中存在肌球蛋白和肌动蛋白。Allen证明血小板中存在肌动蛋白，Stossel等证明巨噬细胞中存在肌动蛋白。Korn等(1973)证明棘变形虫(*acanthamaeba*)中存在肌动蛋白和肌球蛋白。

在绿色植物中Palevitz和Hepler(1974)首先用HMM装饰的方法在电镜中观察到Nitella细胞中存在肌动蛋白(呈箭头状装

饰），并且与其细胞质流动存在密切关系。最近Spudich等（1983）用荧光显微技术证明，用荧光标记的含有重酶解肌球蛋白的微珠可以在Nitella细胞中由肌动蛋白组成的缆绳上"行走"，直观而充分地证明了绿色植物中细胞质流动的动力就是由于肌球蛋白与肌动蛋白的相互作用，与肌肉中的肌动蛋白与肌球蛋白的相互滑动非常相似。

在高等植物中也存在肌动蛋白和肌球蛋白。1963年我们从烟草维管束中分离出肌动球蛋白，具有ATP酶活性。以后，Jackson等（1975）从网球花（*Haemanthus*）胚乳细胞中分离得到肌动蛋白，并认为它与染色体的运动有关。Condeelis（1974）证明孤挺花（*Amaryllis*）的花粉管中存在F-肌动蛋白。最近（1985）我们进一步证明黄瓜等花粉管及豌豆叶片的卷须中除含肌动蛋白外，还存在肌球蛋白，细胞松弛素B（cytochalasin B），可以抑制其原生质流动及花粉管伸长。Vahey等（1983）从番茄内果皮细胞中分离得到肌动蛋白和肌球蛋白。此外在小麦幼芽、玉米胚、大豆幼苗、芹菜韧皮部、松柏科根部都存在肌动蛋白。由此看来，在生物界肌动蛋白和肌球蛋白的存在是普遍的。

2.构成微管的蛋白质

Ledbetter与Porter（1963）在植物（侧柏）细胞中发现微管（mierotubule），同年Slautterback 在动物（水螅）细胞中也发现了微管。微管呈中空的管状，横切面圆形，直径24nm，空腔直径15nm，管壁厚5nm，长数十毫微米，其横切面由13个亚基排列组成（图9·7）。

Tilney等（1973）证明，从原生动物到鸟类，微管的横切面都由13个亚基组成，用负染法可以证明微管的壁是由直线排列的原丝（protofilament）构成，原丝的直径为4—5nm。微管的外形好似由一串串球粒编成的一样。

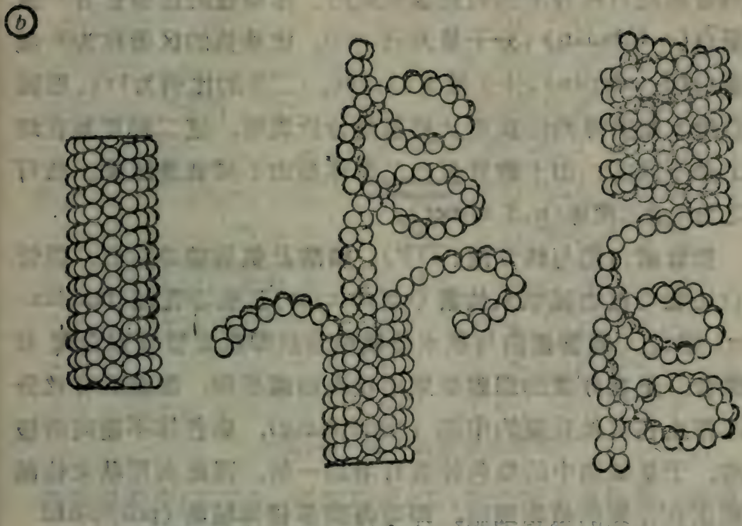


图9·7 微管的示意图
(a.微管 b,c.示原丝组成微管)

首先从纤毛及鞭毛的外围微管中提取构成微管的蛋白质，主要得到一种蛋白质，其沉淀系数为6S，分子量为110,000。如果将这种蛋白质在变性剂胍溶液中使之变性，则其S值和分子量均减少一半，表明这个分子是以二聚体方式存在的，即每个分子由两个亚基组成，每个亚基的分子量为55,000。这个结构相当于用负染法观察到微管壁上具有4—5nm的亚基。根据氨基酸分析，证明从纤毛和鞭毛外围得到的蛋白质是微管所特有的蛋白质，定名为微管蛋白(tubulin)。

早期用SDS聚丙烯酰胺凝胺电泳研究四膜虫(*Tetrahymena*)纤毛的外围蛋白，结果得到二条区带。起初认为它们分别是外围蛋白的微管A和微管B，以后发现这种解释不正确。因为从四膜虫的细胞质中得到的微管蛋白也分为二条区带，表

明微管都是由两种不同的亚基组成的。泳动慢的区带称为α-微管蛋白(α-tubulin)，分子量为56,000；泳动快的区带称为β-微管蛋白(β-tubulin)，分子量为53,000，二者的比例为1:1。用胰蛋白酶水解所得到的肽谱及氨基酸分析表明，这二种亚基在结构上是不同的，由于微管蛋白二聚体是由不同亚基组成，故可称之为α,β二聚体(α,β dimer)。

微管蛋白能与核苷酸(GTP)、磷酸及氨基酸等结合，微管蛋白还能与植物碱秋水仙素(colchicine)及长春花碱(rinblastine)结合。微管蛋白与秋水仙碱结合后即阻止微管蛋白聚合成微管。正在分裂的细胞如果用秋水仙碱处理，细胞的有丝分裂即停止在有丝分裂的中期(metaphase)，染色体不能向两极移动，于是细胞中的染色体数目增加一倍。因此利用秋水仙碱处理正在分裂的植物细胞，即可得到多倍体植物(polyploid plants)。

各种动植物中的微管蛋白都具有其相似的物理化学性质，所有已分离得到的微管蛋白都有相同的分子量及电泳迁移率。对海胆及鸡胚脑的α、β微管蛋白的氨基酸顺序的研究表明，在N-末端的前25个氨基酸残基顺序都没有区别。用荧光抗体技术研究种属差别极大的生物，从哺乳动物到海胆，单细胞绿藻的衣藻(*Chlamydomonas*)以及粘菌、盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)等，它们的微管蛋白都相同。

在活细胞中微管蛋白可以聚合成微管，有时微管又可以解聚形成微管蛋白(图9·8)。这种聚合和解聚是经常发生的，了解清楚这种聚合和解聚的控制过程对认识许多细胞的生命过程是很重要的。

如果条件合适，微管蛋白二聚体即聚合成微管。促进微管蛋白聚合的条件是：pH微酸性(6.6—6.7)、存在GTP、Mg^{++}

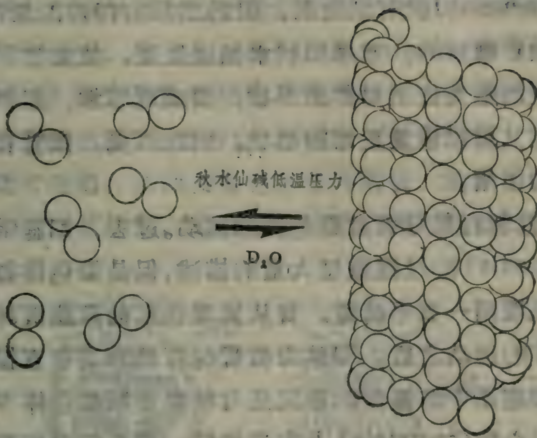


图9·8 微管的聚合和解聚

和生理温度(37℃)。温度降至0℃，微管即迅速解聚，较高浓度的Ca^{++}能强烈地抑制微管蛋白的聚合(10m*M*可降低聚合反应的50%)。

3. 微管的功能

微管在细胞的生命活动中担负着重要的作用，主要有下述的生物学功能：(1)作为细胞骨架，维持细胞的形状；(2)控制细胞产物的分泌，建造细胞壁；(3)细胞分裂时控制染色体的运动；(4)构成纤毛及鞭毛，作为细胞的运动器官。

(1)维持细胞的形状。微管是细胞的骨架，动物细胞及某些低等细胞在缺少坚硬的细胞壁时仍然可以保持非圆球的形状。电子显微镜的观察研究表明，在这些不对称的细胞中存在大量微管，细胞的不对称性与其中存在微管是相关的，这可以用血液中的红细胞证明。红细胞呈双凹圆盘状，中央部分较薄，边缘部分较厚，如果用秋水仙碱或低温处理这些细胞，使其中的微管蛋白不聚合成微管，则它即成圆球的形状。一种单细胞绿

藻(*Ochromonas*)没有细胞壁，但仍然具有特殊的梨形，这种形状是靠微管维持的。如果用秋水仙碱处理，使微管不能聚合，结果即使细胞失去不对称的形状，变成圆球形。如果去掉秋水仙碱，它又可以恢复正常的形状。由此可见，微管在细胞中担负骨架的作用。

(2)控制有丝分裂时染色体的运动。过去，细胞学家对有丝分裂(mitosis)的过程做过大量的描述，但是染色体如何运动到两极的机理则一直不清楚。自从发现秋水仙素能破坏微管并停止染色体的运动之后，即认为微管与有丝分裂有直接的关系。

在细胞质中纺锤体的形成是与核中前期染色体同时出现的。在中心粒(centriole)上出现微管，中心粒向细胞核的两极移动，可能是由于微管的生长。当前期结束时，核膜破裂使核质与细胞质混合，微管就穿过完全成形的染色体。这时微管在染色体的动粒上聚合成动粒微管(kinetochore microtubule)。有些微管从一极直通到另一极，称为极间微管(interpolar microtubule)。还有一些微管连到两极上称为极微管(polar microtubule)，这时纺锤体即完全形成，染色体排列在赤道板上，成为以后中期运动时的起始线，每个染色单体的动粒即朝向两极。

关于有丝分裂的机理目前主要有两种模型，第一，认为染色体运动是由于组成纺锤体丝的微管的解聚产生的；第二种认为是由于肌动蛋白-肌球蛋白的相互作用使染色体运动。后者将在下节讨论。

目前的研究集中于分裂后期。这期包含两个阶段：①染色体向两极移动；②纺锤体伸长使两极分开，同时使染色体分开。前者使连接染色体与两极的微管(动粒微管)缩短，而后者需要极间微管的伸长。

井上早在1953年用偏光显微镜证明植物和动物细胞的纺锤体中存在丝状成分，并且有双折射现象(birefringence)。井上及Ritter(1975)认为微管的解聚是推动染色体运动的力量，逐步去掉微管上的亚基(微管蛋白)，可以使微管缩短，动粒微管的解聚使微管缩短，从而使染色体移向两极。如果用秋水仙碱处理细胞，使微管解聚，染色体即移动。将细胞放回到正常条

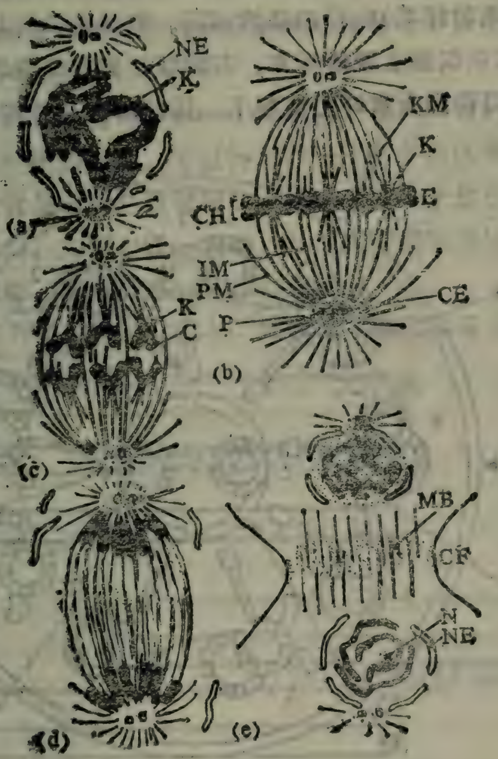


图9·9 染色体的运动
(a)前期 (b)中期 (c)后期
(d)末期 (e)分裂沟形成

件下，纺锤体重新形成，染色体又回到赤道板的原来位置上。不论天然的或人工诱导的情况，染色体的运动都直接与组成纺锤丝的微管的解聚成正相关。因此，他们认为微管的解聚是推动染色体运动的动力(图9·9)。

(3)纤毛与鞭毛的运动。动物及植物的纤毛(cillia)和鞭毛(flagella)是细胞表面上突起的特化的结构，使这些细胞能够运动，如衣藻的鞭毛、精子的鞭毛和草履虫的纤毛等。这两类细胞器(鞭毛和纤毛)的形态虽然不同，但是结构上基本相同，它们很容易从细胞上脱落下来，有时强烈振荡细胞的悬浮液(如衣藻)即可得到大量纤毛或鞭毛，因此研究其结构及化学组成

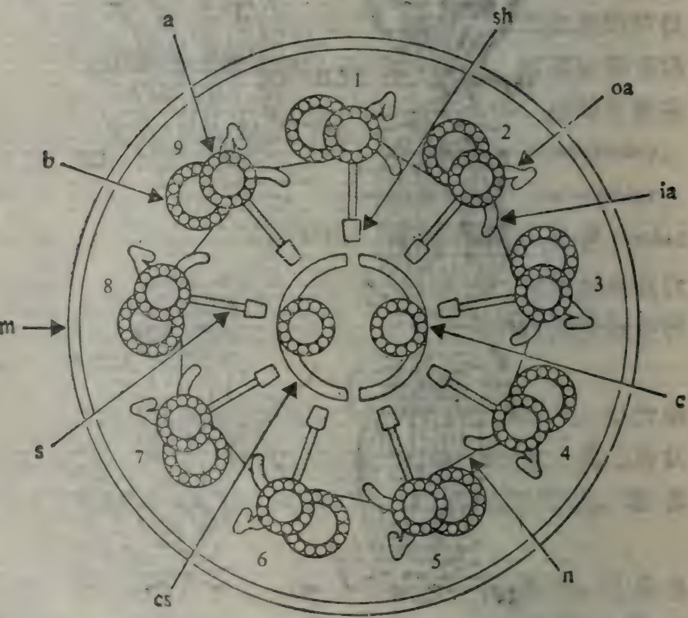


图9·10 纤毛结构示意图(横断面)
m.膜 A,B.外围微管 oa,ia.外层及内层的臂
s.辐条 sh.辐条头部 c.中心微管

是相当容易的。

纤毛或鞭毛都是由一束纤维丝被一层膜包围，这层膜与细胞的质膜相连通，其中的纤维丝就是微管，周围有9对微管包围着中心的2个单一的微管，这种排列称为9+2结构。2个中央的微管直径为24nm，而9对外层的微管每对大小为37×25nm，外围的微管每个包围一个亚纤丝A(subfiber A)及一个亚纤丝B(subfiber B)。从亚纤丝A上伸出两个臂(arms)，所有的臂都朝着同一方向，用去污剂及高浓度盐溶液处理纤毛可以使这些臂脱落下来(图9·10)。

微管的臂是由力蛋白(dynein)组成的，用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳研究鞭毛的成分，可以得到20—30个多肽区带，其中有两个为α-微管蛋白及β-微管蛋白，另一个为分子量很高的力蛋白（700,000)。力蛋白是一种酶，具有ATP酶的活性。力蛋白有两种同功酶，即力蛋白1和力蛋白2。

实验证明力蛋白通过它的ATP酶活性在鞭毛和纤毛的运动

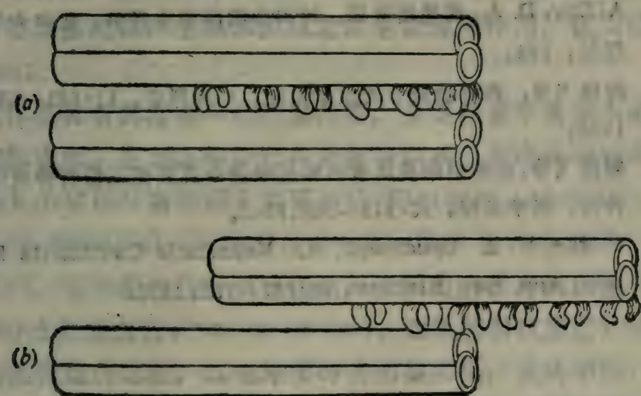


图9·11 微管滑动的示意图
（微管之间的臂为力蛋白组成）

中起着重要作用。力蛋白可以使相邻的微管进行滑动(图9·11)，从而使鞭毛局部弯曲，发生运动。对动物的研究表明，由于遗传缺陷而不育的雄性细胞是由于缺乏力蛋白，因而精子的鞭毛不能运动所致，这对研究动物的雄性不育问题可能很有意义。

参考文献

1. Harrington, W. F.: Contractile Proteins of Muscle in The Proteins (Neurath & Hill editors), 3rd edition vol. IV., Academic Press, 1979.
2. Stebbing, H. & Hyams, J. S.: Cell Motility, Longman, 1979.
3. Porter, K.: Motility 专辑，J. Cell Biol., vol. 91 No. 3 P. 2 1—124, 1981.
4. Lloyd, C.: Cytoskeleton in Plant Growth and Development.
5. Gibbons, L. R.: Cilia and Flagella of Eukaryotes, J. Cell Biol., vol. 91 No. 3 P. 2 107—124, 1981.
6. Aidley, D. J., 周爱培等译：可兴奋细胞的生理学，北京大学出版社，1983。
7. 阎隆飞等：高等植物中的收缩蛋白，中国科学，14:601—608, 1965。
8. 阎隆飞等：花粉中的肌动蛋白和肌球蛋白及其在花粉管伸长中的作用，科学通报，30:945—948,1985。
9. Clarke, M. & Spudich, J. A.: Nonmuscle Contractile Protein, Ann. Rev. Biochem. 46:767—782, 1977.

第十章　免疫球蛋白与防御作用

一、引言

动物对病原微生物的侵袭有防御的功能。它们的主要防御方式有二种：(1) 首先是白血球向受侵部位的微生物方向运动，吞噬并破坏掉此外来侵袭物；(2) 其次是某些细胞（浆细胞）制造出抗体(antibody)并分泌于血液中，抗体能与侵入的病原物进行专一性的结合而使之失去侵染力。侵袭因子的某一部分具有刺激机体产生抗体并与之发生反应的作用，称为抗原(antigen)。

抗体是具有高度专一性的蛋白质，主要存在于血清中或表现在细胞表面。正常血清中含有大量蛋白质。在电泳时按照迁移率的大小可以分离为四大类蛋白质，即白蛋白 (albumin)，α-球蛋白(α-globulin)，β-球蛋白(β-globulin) 及γ-球蛋白 (γ-globulin)。动物经过注射抗原后所产生的血清称为抗血清(antiserum)或免疫血清(immune serum)。动物注射抗原后产生的血清与正常血清比较，其电泳图即有明显变化，血清中的γ-球蛋白或迁移率较慢的β-球蛋白显著增加。所增加的球蛋白就是抗体，目前国际上统一命名为免疫球蛋白(Immunoglobulin)，简称Ig。

抗原通常是蛋白质大分子或多糖分子表面的一部分，与微生物表层结构结合在一起，所以细菌、病毒及细菌毒素的表面都不止有一个抗原部位，因而可以诱导出多种不同的专一性的抗体。在血液中抗体与相应抗原结合就修改了侵入微生物的表面结构，不但使白细胞易于吞噬微生物并将它们消化掉，而且多数抗原与抗体相连接成为沉淀而失去活力的复合物，使之失去侵袭力及毒力。抗原主要来自异种生物或同种生物的异体。抗体有识别“自己”(self)和“非己”(nonself)的能力。近年来由于分子生物学的进展使我们对免疫球蛋白的三维结构及其与抗体的结合部位有了深入的了解，从而对免疫球蛋白识别“自己”及“非己”的本领也有了一定的认识。免疫学(immunology)是研究生物的免疫系统内容十分丰富的科学，本章不可能涉及其所有内容，只简单介绍免疫球蛋白的结构与功能。

二、抗原

抗原(antigen)一词最早的概念是指一种能在脊椎动物体内引起抗体的产生并与相应抗体起反应的物质。但抗原诱发的动物反应是复杂的，不同抗原或同一抗原对不同种类或个体可能引起不同的反应，可以产生抗体(液体免疫)，也可致敏免疫细胞(细胞免疫或免疫耐受)，它能和抗体或致敏淋巴细胞在体内或体外发生特异性的结合。所以抗原的概念有两个重要方面，即免疫原性(immunogenicity)和抗原专一性(antigen specificity)。免疫原性是指引起免疫反应的能力，而抗原专一性是与抗体结合位点的性质的反映，因为这种专一性是由抗原的化学结构即整个分子的空间构象以及局部的基团(抗原决定簇)决定的，本章只重点介绍抗原的专一性。

1.人工抗原专一性的分子基础

天然抗原大多数是蛋白质，其结构复杂，且专一性的分子基础不易分析。自从人工将一个已知结构的简单分子连接在蛋白质上得到抗原专一性的知识以后，Landsteiner(1919)将一个简单分子连接到芳香族胺类(如苯胺)分子上，然后重氮化，再通过酪氨酸残基与蛋白质结合形成偶氮蛋白质（azoprotein)。这一简单分子的化学基团决定了抗原专一性，称为半抗原（hapten)，也就是抗原决定基（antigenic determinant)。它有高度的免疫学专一性，而与之结合的蛋白质的作用是作为载体（表10·1，表10·2)。由表10·2可见，半抗原决定簇在空间构象上和抗体结合部位之间以空间互补的密合程度决定其反应程度。各种低分子量的对苯砷酸衍生物能竞争性地抑制具有对偶氮苯砷酸衍生物决定簇的结合蛋白及其抗体反应。可见免疫专一性主要依赖于表面决定簇形状和稳定性。这可以证明抗体分子只和抗原表面的一定化学基团起反应而不是和整个大分子表面起反应。例如，增加半抗原的极性基团就可以增强其免疫原性。

至于载体蛋白对抗体反应也是有影响的，如用一个结合蛋白半抗原A的体液抗体能和同一半抗原A加另一载体B的结合蛋白起反应，称为交叉反应（cross reaction)。但是，如果用半抗原A加另一载体B第二次免疫此动物时，并不能刺激次级免疫反应，此时，半抗原A的抗体反应仍然出现初级免疫反应的特点，也就是说，虽然半抗原A没有改变，只是载体B不同于初级反应中所用的载体A，结果抗体的产生也受到影响，这一现象称为“载体效应”(carrier effect)。这个实验表明，免疫活性细胞对载体决定簇的识别是诱导体液抗体的产生以及对半抗原决定簇本身识别的必要前提。还有许多实验表明，载体效应是抗体形成中两类淋巴细胞——T 细胞和B细胞协同作用

的结果，我们可以假定T细胞的抗原受体带有载体专一性，而B细胞的抗原受体带有半抗原专一性，因而抗体反应总的呈现在载体效应。

表10·1　　化学决定簇的组成对抗原专一性的影响

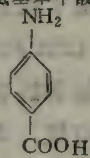
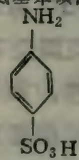
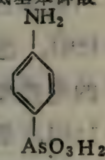
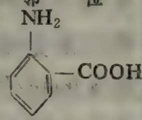
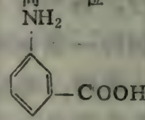
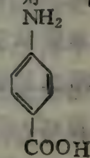
抗下列物质的抗血清	抗原			
	苯胺 	对氨基苯甲酸 	对氨基苯磺酸 	对氨基苯砷酸 
苯胺	+++	–	–	–
对氨基苯甲酸	–	++++	–	–
对氨基苯磺酸	–	–	++++	–
对氨基苯砷酸	–	–	–	++++

表10·2　　决定簇空间构型对抗原专一性的影响

抗下列物质的抗血清		抗原			
		苯胺	氨基苯甲酸		
			邻位 	间位 	对位 
苯胺		++	–	–	–
氨基苯甲酸	邻位	–	+++	–	–
	间位	–	–	+++	–
	对位	–	–	–	+++

2.蛋白质免疫原性的分子基础

蛋白质分子的构象对其生物学功能是非常重要的，作为抗原来说，特定的局部构象就是抗原决定簇。所以蛋白质变性或改变某一残基的侧链，构象就发生改变或破坏，抗原性也随之发生改变或破坏。蛋白质是结构复杂的大分子，它的免疫原性和抗原专一性是暴露在大分子表面的各种决定簇的空间排列图式。所以，蛋白质抗原的专一性可能依赖于分子的各级结构。当注射纯化的蛋白质抗原(化学上均一的)，却产生质和量都不同的抗体(不均一的)。能诱导出高浓度的专一抗体的决定簇，称为免疫优势（immunodominant)，就是作为免疫原的蛋白质除了分子构象引起免疫反应的能力外，更重要的是取决于一系列因素。首先是"外源性"，这样的抗原分子表面具有免疫活性细胞从未接触过的决定簇。其次是分子的大小，一般情况是分子量要大于10,000，例如，可溶性蛋白如卵清蛋白（分子量超过40,000)，都是很好的免疫原。低分子多肽或蛋白质片段也能引起免疫反应，但应在一定条件下，例如加佐剂（adjuvant)才是很好的免疫原。抗原分子的大小、形状只有在它反映出分子结构的复杂性和有效决定簇的数目和排列时才能决定其免疫原性，如种属差异表现在氨基酸顺序，所以蛋白质分子表面局部构象有显著差异，才是良好的免疫原。

3.影响抗原反应的因素

(1）佐剂。一种物质和抗原一起注射时可增强抗原的免疫原性或改变免疫反应的类型，这种物质便称为佐剂。如小分子可溶性抗原，可吸附在胶体颗粒上，提高产生抗体的能力。但是免疫学实验更常应用的是多种成分配合的复合佐剂。具有佐剂作用的物质不只一种，其重要的共同性质就是表面活性。表现活力的条件是化合物必须是碱性并含有长的烃链。现在介绍最

常用的Freund佐剂。

Freund(1951)将抗原与石蜡油混合，借助乳化剂（羊毛脂或Arlacel A)作用研磨成一种油包水(W/O)的乳液，注射一二次后就可产生效价(titer)高而持久的抗体，称为Freund不完全佐剂(石蜡油+乳化剂)。如再加入死的分枝杆菌（Mycobactrium)或卡介苗(B. C. G)还可以再增高抗体效价，并引起迟发型超敏感反应（hypersensitivity)，这种佐剂称为 Freund完全佐剂(石蜡油+乳化剂+分枝杆菌)。近年来发展出一种比较安全的佐剂65（花生油+单硬酯酸铝+ Arlacel A.)。当佐剂65加入双链多聚核苷酸(poly I:C 或 poly A:U)时，佐剂作用还要加强。

Freund 佐剂的作用还依赖注射的途径，对一般实验动物以足掌或皮内注射效果最好，这可能是由于这一部位小淋巴管分布较多，易于进入淋巴结。目前佐剂的研究和应用受到极大重视，不但在疫苗(vaccine)制备上可以增加免疫原性，而且在治疗上也作为免疫增强剂。它是一种多克隆刺激剂，刺激T细胞和B细胞的增殖和成熟，也刺激巨噬细胞增强其吞噬活力，或改变在淋巴器官内的阻留部位，从而获得或提高免疫原性。

(2) 动物反应性。免疫反应是动物体对抗原的反应，所以要受到动物遗传性、发育时期和生理状态等多方面的影响，同一种抗原在不同物种、不同品系、不同个体上都有不同免疫反应的能力。这些差异是遗传的，受一个显性基因控制。目前认为免疫反应性的遗传是受免疫反应基因(Ir基因)控制的，分别决定T细胞和B细胞表面受体的构造。此外，同一动物注射两种抗原后引起抗体的产生通常是不同的。一种抗原也可以抑制另一种抗原的反应，称为抗原竞争现象(antigen competition)。免疫反应在质和量上受抗原剂量的影响较大，大多数蛋白质抗

原不加佐剂时注射一次只引起微弱的抗体反应，时间上也比较慢，必须经过多次注射，才能产生抗体。同时不同种类的免疫原在注射剂量上有很大差别，当超过最低剂量的阈值后，随着剂量的增高达到最适抗体反应区，然后又下降不起抗体反应，也就是达到免疫耐受性或免疫麻痹(immune paralysis)。

三、抗体

抗体是能与相应的抗原专一性结合的蛋白质分子，和机体其他生物大分子一样是细胞的产物，分泌到体液中或表现在细胞表面上。抗体主要存在于血清之中，动物被注射抗原以后，血清中的球蛋白发生明显变化。从图10·1可以清楚地看到注射抗原后，血清中γ-球蛋白的增加。

1.免疫球蛋白的结构

正常动物血清中含有多种免疫球蛋白，其基本结构和化学性质是相似的。抗体的一个重要特点是具有高度专一性，因此想要大量分离出某一抗体进行化学结构的研究是很困难的。目前关于免疫球蛋白的结构知识都是来自多发性骨髓瘤（myeloma)患者产生的抗体，它所分泌的同质性的Ig占血清Ig的95%，所以它易于提纯，以进行结构研究。

研究免疫球蛋白的结构首先要进行纯化。将免疫球蛋白与其它球蛋白及白蛋白分离开的方法有很多种，其中最常用的方法是盐析与离子交换层析相结合，此法包括三个步骤：①在血清中加硫酸铵，使球蛋白沉淀，而将白蛋白留在溶液中；②将沉淀物离心，再重新溶解，透析以去掉小分子化合物；③将重新溶解的球蛋白通过DEAE纤维素柱，调节 pH 及离子强度，使其它球蛋白都与纤维素结合，而让免疫球蛋白流出收集起来即得

到相当纯的Ig。

Porter(1957)用木瓜蛋白酶(papain)处理 Ig，将此分子切成三个片段(分子量均为45,000)。其中两个片段具有与抗原结合的能力，故称为Fab片段(antigen binding fragment)。这些片段能与抗原结合，但不能使之沉淀，它们是单价的，它们只

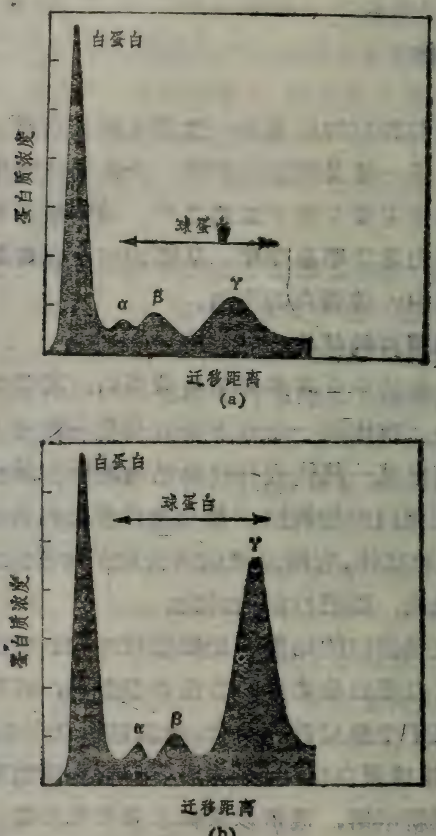


图10·1　血清的电泳图(自由界面电泳)
(a)正常血清　(b)注射抗原后的抗血清

有一个结合部位，而完全的Ig分子既能与抗原结合又能使之沉淀，故它们具有两个结合部位。第三个片段可以从溶液中结晶出来，Porter称之为Fc(crystalline fragment)，它们在抗体中变化不大(图10·2)。

Edelman(1959)用巯基乙醇处理Ig，打断Ig分子中的二硫

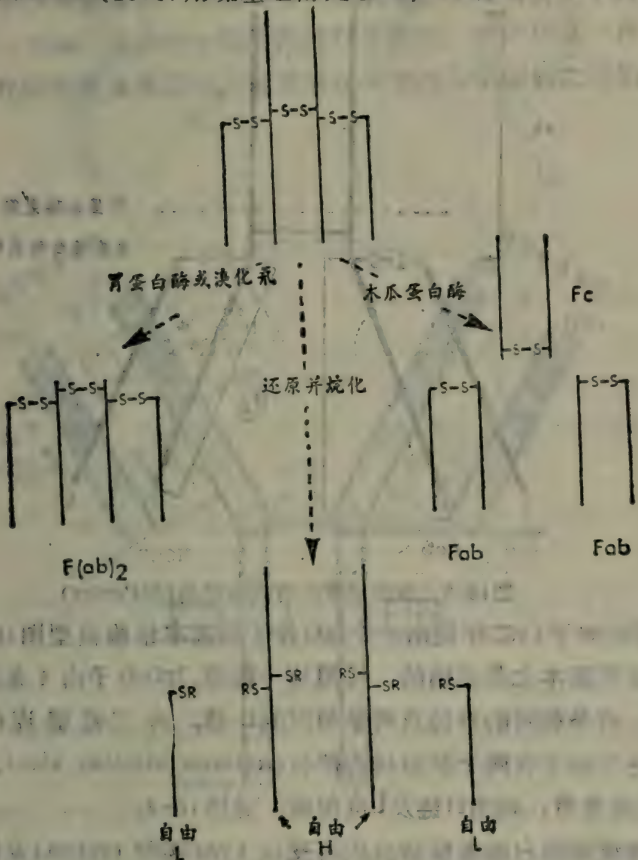


图10·2　免疫球蛋白IgG经酶及化学降解后所得的片段Fab及Fc

键，得到 4 条肽链，其中两条分子量各为53,000，称为重链(heavy chain)，另外两个分子量各为22,000，称为轻链(light chain)。

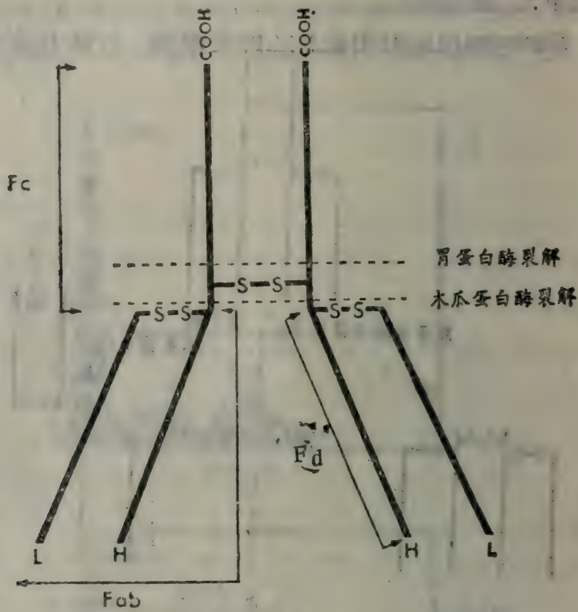


图10·3　免疫球蛋白的基本结构(据Porter)

Porter于1962年提出一个IgG分子的基本结构模型图10·3，现已证明基本上是正确的。按照这个模型，IgG分子由 4 条肽链组成，两条相同的H链及两条相同的L 链，由二硫键连在一起，这个分子有两个抗原结合部位(antigen binding site)，由Fab片段携带，均由H链及L链组成，见图10·4。

免疫球蛋白的多肽链分成可变区 (variable region)及恒定区(constant region)两部分。Craig等测定了骨髓瘤(myeloma) IgG的两条轻链的顺序，证明从C末端到第107个残基的顺序两

个链完全相同，而从N末端到第106残基则完全不一样，因此，L链可分成二部分，即可变区和恒定 区。Edelman 证明重链也是如此。其可变区(V_H) 从N末 端到相同长度，约116个残基，而恒定区 (C_H) 约3倍于此长度，即330个残基。免 疫球蛋白的氨基酸顺序异常复杂，特别是可变区的顺序变化更大。不过现在已对一些IgG 分子的一级结构进行了测定，图10·5是一种人的 IgG轻链的氨基酸顺序，可以看出可变区与恒定区之间的差异。

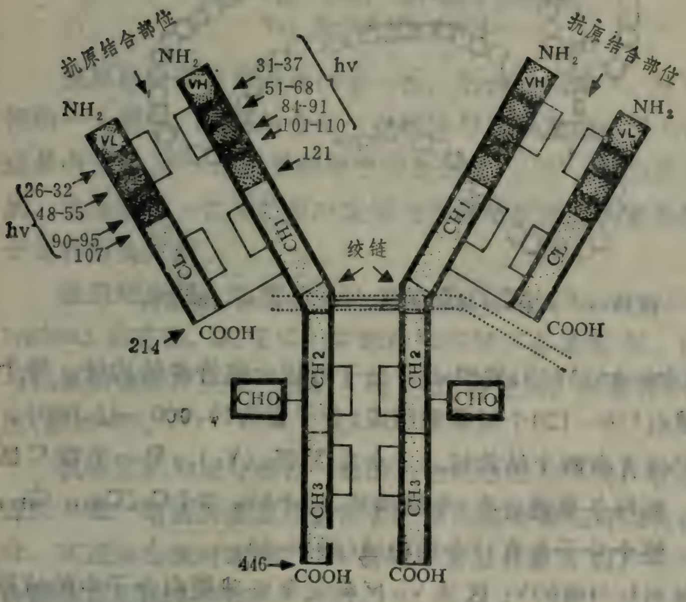


图10·4　免疫球蛋白IgG分子示意图

H.重链　L.轻链　C.恒定区　V.可变区

CHO.碳水化合物　hinge.铰链区。



图10·5　人的κ轻链的恒定区及可变区的一级结构

Edelman(1969)发现 IgG 分子可以分成许多结构域，每个结构域由110—120个氨基酸组成(分子量为10,000—12,000)。每条轻链含有两个结构域，一个在 V 区 (V_L)，另一个在 C 区 (C_L)，而每条重链含有4个结构域，1个V_H，3个C_H(C_{H1}，C_{H2}，C_{H3})，整个分子含有12个结构域(图10·6)。

每对L-H链的V_L 区及 V_H 区构成免疫球蛋白分子中的抗原结合部位 (antigenbinding　site)，每个IgG分子至少有两个相同的抗原结合部位，使抗体能与两个以上抗原的决定簇交叉连结。

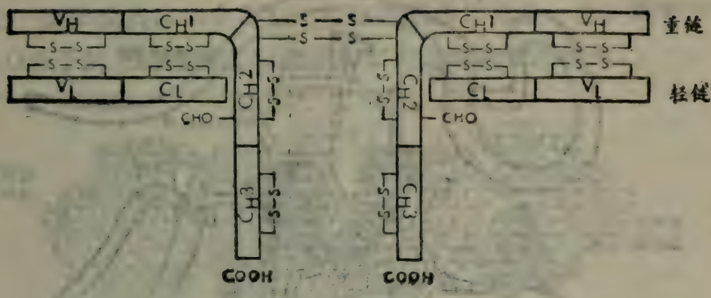


图10·6 IgG的结构域
（V_H，C_{H1}，C_{H2}，C_{H3}代表重链结构域，
V_L、C_L代表轻链结构域）

抗原结合部位能表现出专一性，活性部位是V_L与V_H区之间的一个裂隙，抗原结合部位在抗体与抗体之间有很大差异，这是由于V_L及V_H区氨基酸顺序的差别及V_L与V_H区的关系的区别，抗体的专一性是抗原决定簇与抗体活性部位的氨基酸的分子互补所决定的。

抗原结合部位的壁是由V_L及V_H的高变区(hypervariable region)构成的，高变区的氨基酸顺序特别容易变异，以适应与抗原结合并产生专一性。L链有3个高变区，H链有4个高变区(图10·7)。

抗体的抗原结合部位与酶的底物结合部位不同，它由两条链而不是一条链折迭成结合部位，因此结合部位可以有很多组合。在抗体合成时靠L链和H链的各种组合就可以产生抗原结合部位很大的多变性。

目前IgG分子已得到结晶并进行了X-射线衍射分析，Silverton等(1980)获得了IgG的三维构象的精细结构，完全证实了免疫化学家们的预测(图10·8)。IgG分子包含两条重链和

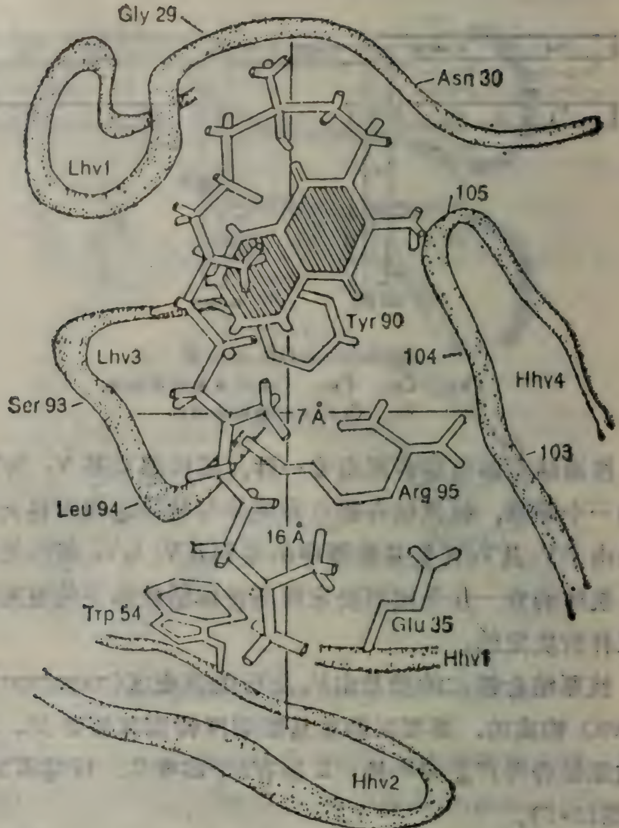


图10·7 IgG分子的高变区示意图
（中央为维生素K_1OH半抗原，Lhv1，Lhv3，Hhv1，Hhv2，Hhv4表示L链及H链的高变区的位置）

两条轻链，由12个结构域组成。每个结构域的大小为4×2.5×2.5nm，每个结构域含有两层β-折迭片，一层为3条β-折迭，另一层为4条，都是反平行的，在可变区中由3个高变圈(hyper-

variable loops)排列成高变区。L链及H链的可变区的高变圈集结在一起形成抗原结合部位，与预测的情形完全一样。图10·8为IgG分子的三维结构及可变区和恒定区结构域的结构。

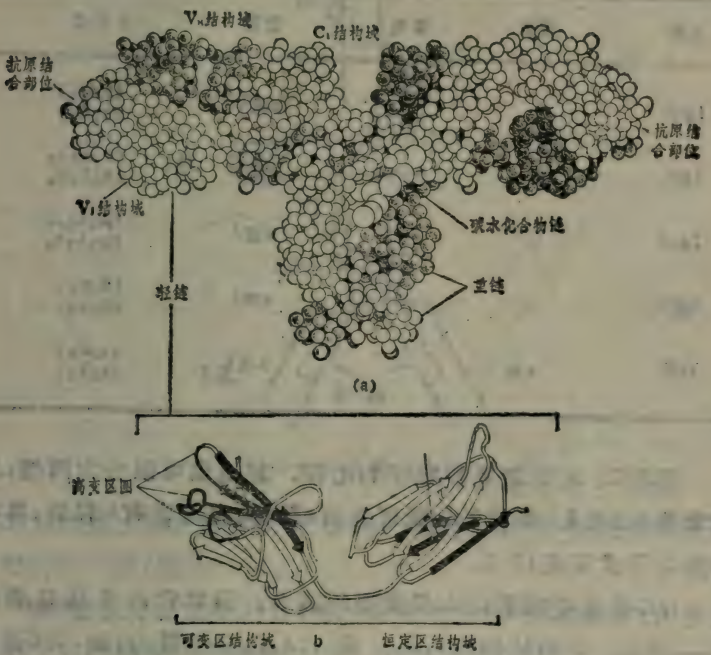


图10·8 IgG的三维结构

a.IgG分子，每个圆代表一个氨基酸残基

b.可变区及恒定区的结构域

2.免疫球蛋白的种类

免疫球蛋白有5种，即IgG，IgA，IgD，IgE和IgM。这五类免疫球蛋白在重链的恒定区有结构上的差异。比较C_H区的氨基酸，顺序结果表明存在五类重链，分别为α、γ、δ、ε和μ，这五类重链分别与IgA，IgG，IgD，IgE及IgM相对应，有些类

还可分为一些亚类，如γ类可再分为γ_1、γ_2、γ_3及γ_4亚类，详见表10·3。

表10·3　　人免疫球蛋白的五类亚基结构

类别	重链	亚类	轻链	分子式
IgG	γ	γ_1,γ_2 γ_3,γ_4	κ或λ	$(\gamma_2\kappa_2)$ $(\gamma_2\lambda_2)$
IgA	α	α_1,α_2	κ或λ	$(\alpha_2\kappa_2)_n$ $(\alpha_2\lambda_2)_n$
IgM	μ	—	κ或λ	$(\mu_2\kappa_2)_5$ $(\mu_2\lambda_2)_5$
IgD	δ	—	κ或λ	$(\delta_2\kappa_2)$ $(\delta_2\lambda_2)$
IgE	ε	—	κ或λ	$(\epsilon_2\kappa_2)$ $(\epsilon_2\lambda_2)$

根据C_L区的氨基酸顺序的比较，轻链也可以分为两类，这两类称为κ及λ，每类的Ig既可含有κ轻链，也可含有λ轻链，各类Ig的分子式见表10·3。

IgG是免疫球蛋白中最重要的成分，通常它占抗体总量的80—85%。它的结构为$\gamma_2\kappa_2$，或$\gamma_2\lambda_2$，分子量为150,000道尔顿。重链含有420-440个氨基酸残基，轻链含210-230个残基。碳水化合物的含量占2.9%。

IgA占抗体总量的10%左右。它的结构是$(\alpha_2\kappa_2)_2$或$(\alpha_2\lambda_2)_2$，是一种IgG的二聚体，靠J链连接在一起。分子量为180,000—500,000，碳水化合物的含量占7.5%。婴儿从母乳中可以摄取IgA（图10·9）。

IgM占抗体总量的5—10%。它是一个环状的五聚体，其结构式为$(\mu_2\lambda_2)_5$或$(\mu_2\kappa_2)_5$，分子量为950,000。IgM中含有

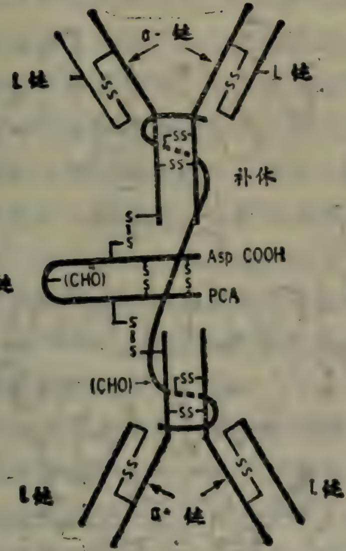


图10·9 IgA的示意图

11.8%的碳水化合物。动物免疫后首先出现IgM，在IgM分子中也含有J链(图10·10)。

IgD在抗体总量中只占1%，它的结构为$\delta_2\lambda_2$或$\delta_2\kappa_2$，目前我们对它的功能了解很少。

IgE在抗体中含量最低，只占0.01%。它的结构为$\epsilon_2\lambda_2$或$\epsilon_2\kappa_2$，分子量约为196,000。IgE中含有10.7%的碳水化合物。IgE的功能与某些过敏反应有关。

虽然所有免疫球蛋白分子可能以相似的方式结合抗原，但不同的免疫球蛋白具有不同的生理功能。这五类的功能差异反映出它们的重链恒定区的结构上的差异。

3.单克隆抗体

抗体由B淋巴细胞合成，B细胞存在于脾 淋巴结和血液中。

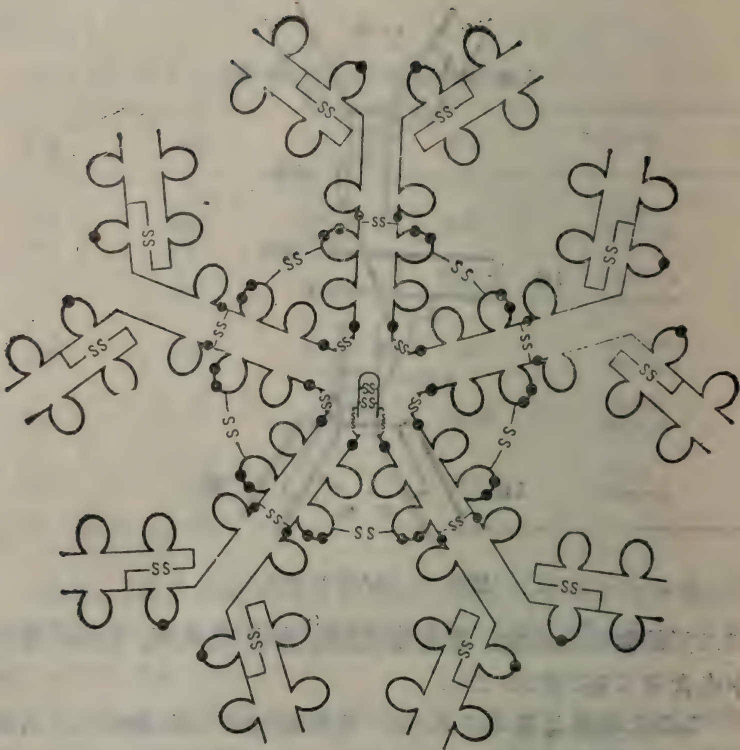


图10·10　IgM的示意图

每个B细胞都有合成某一种抗体的基因，不同基因的细胞只识别一种抗原，而在一定时期内合成不同的专一性抗体。但抗原分子上有很多决定簇，抗原侵入机体后，抗原决定簇分别激活各个具有不同基因的B细胞，被激活的B细胞经过分裂增殖，形成许多克隆(clone)，并合成各种抗体。一般抗血清即属于多克隆抗体(polyclonal antibody)，所以抗原决定簇愈多，产生的抗体愈复杂，这一系列免疫细胞增殖过程只能在机体内完成，免

疫动物的淋巴细胞不能在体外生长。由于研究工作的广泛深入，50年代即发现骨髓瘤患者细胞产生大量结构相同的免疫球蛋白并且宿主无法控制其不断的增殖。继肿瘤细胞可以融合的观察之后又发现骨髓瘤可以在体外增殖生长，所以取免疫动物的脾细胞与具有酶缺陷的骨髓瘤细胞融合，将各个融合细胞分开培养(克隆化)，分别接种小鼠腹腔，或扩大培养后，收集小鼠腹水或培养物上清液，其中含有大量高效价的专一性抗体，这种属于单个融合细胞培养增殖的细胞群所产生的抗体称为单克隆抗体(monoclonal antibody)。单克隆抗体是化学上均一的免疫球蛋白，是研究免疫化学的极好材料。

单克隆抗体技术基本原理是免疫动物的脾细胞与骨髓瘤细胞融合杂交，但融合细胞毕竟是少数，在融合过程中必有大量细胞未融合，这时免疫细胞不能在体外生长，十几天培养自然死亡，而未融合的骨髓细胞可以迅速增殖，所以需要抑制骨髓细胞以利融合细胞的生长。采取的措施首先要选择有酶缺陷的骨髓细胞进行杂交。Milstein等用正常浆细胞和浆细胞瘤细胞杂交，获得长期分泌专一性抗体的单克隆细胞，此后又诱导出不合成固有免疫球蛋白重链的变异细胞，称为 P_3-NS1-Ag4-1，简称为NS-1。这一细胞株与免疫动物的B细胞杂交，获得长期分泌大量专一性免疫球蛋白的细胞株。这是制备单克隆抗体的重要手段。其次是细胞融合后的培养基，目前应用的HAT培养基，主要成分为次黄嘌呤(H)、氨基嘌呤(A)及胸腺嘧啶(T)，其中A可阻断DNA合成的主要途径。未融合的骨髓瘤细胞因缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核苷转换酶(HGPRT)或缺乏胸腺嘧啶激酶(TK)而不能合成DNA，而融合后的细胞继承了B细胞中HGPRT和TK，利用培养基中H和T而合成DNA进行繁殖。

四、抗原抗体的相互作用

抗原抗体专一性结合的特点是在抗原与淋巴细胞表面的受体结合激发免疫反应，即免疫细胞对抗原分子的识别、活化、分化和效应过程，以及体液免疫的抗体的产生，称为免疫应答反应(immune response)。

实验室中利用的抗原抗体专一性反应即血清学反应(serological reaction)，对一般生物化学工作是很重要的，因此我们扼要予以讨论。免疫化学家早在30年代即以网格学说(network theory)来解释沉淀反应的机理。Pauling等(1942)开创的半抗原抗体反应的专一性结构提供了基础知识。目前认为抗原抗体的专一性的相互作用只局限于大分子表面的特定部位，就是抗原决定簇和抗体结合位点之间。抗原抗体结合并没有共价键形成，而是特定部位之间分子力相互作用的结果。所以决定簇和结合位点必须处于紧密接触状态才有足够的结合力。因此，抗原抗体反应的专一性是由于分子间空间的互补性，它和酶与底物之间的作用有基本的共同之处。

抗原抗体反应的测量及分析在免疫学发展中作为一种重要手段，由于免疫化学技术在临床医学中对组织或血清中重要分子进行极微量的测定，因此在现代医学和生物学的发展上起了重要作用。利用免疫技术的高度专一性和灵敏性可以作为鉴定结构非常近似的物质、特别是研究蛋白质的有力工具，也可以用于简单物质在溶液中构象的研究。超微量分析的灵敏度可以达到毫微克(ng)或微微克(pg)，标记抗体示踪法能在显微或亚显微水平上追踪抗原在细胞内的分布。细胞内原位的分析对于蛋白质化学及核酸各级结构的分析都有很大的帮助。

1.抗原抗体反应由不溶性复合物的形成来测定

抗原抗体复合物从溶液中沉淀出来，沉淀反应（precipitation）能用以测定被测标本中抗原抗体的量。多价抗原与多价抗体可以形成大的不溶性网状结构复合物沉淀，单价抗体如Fab则不能形成沉淀而形成可溶性复合物，但天然蛋白质或多糖大分子具有许多决定簇，具体数目又不易测定，这时可在已知抗原大分子上连接已知数目的半抗原。只有当半抗原数目在2以上才能和相应抗体产生沉淀反应，所以，抗原和抗体的多价性是形成沉淀物的必要条件。具有两价以上的抗体和多价的抗原作用可连成一个大的网格状聚合物沉淀出来，这就是网格学说的基本概念。抗原抗体浓度基本上相等时才能形成沉淀复合物，抗体过量时一个抗原分子被几个抗体包围而阻碍网格形成，而多余的抗原可使抗体结合位点饱和，也阻碍了网格的形成。标

上清液

自由抗原	－	－	＋	＋
自由抗体	＋	－	－	－

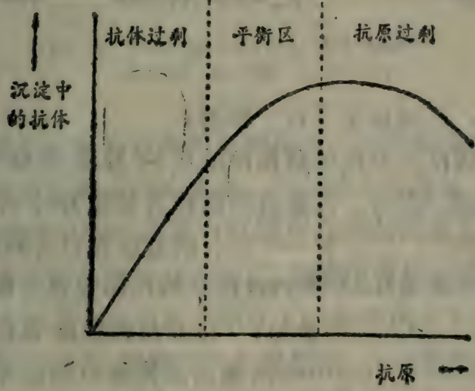
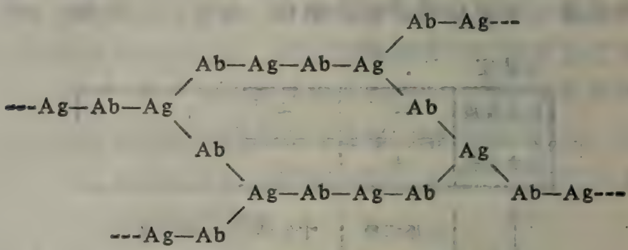


图10·11 定量沉淀反应

准的沉淀曲线用抗原和抗体的标准溶液可以得到。如一系列抗血红蛋白血清每管0.1ml，加入递增量的纯血红蛋白，混合静置后收集得到的沉淀物，在上清液中可测出多余的抗体和抗原。沉淀物的量与所加抗原量得到的曲线(图10·11)在上清液中不出现过剩抗原或过剩抗体时为沉淀曲线的平衡区（equivalence point）。由图10·11可见在平衡区偏右处能迅速地产生最大量沉淀。此时抗原抗体的比例称为最适比例。对于一定的抗原抗体系统，不管二者的稀释度如何，比值是固定不变的。制出的曲线可用于不知浓度的被测标本中抗原的量。按网格学说可以推论当抗原为二价时就产生直链的---Ag-Ab-Ag-Ab--或环形复合物，如抗原有三个或三个以上的决定簇时，就可以产生叉链，交错地形成立体的网格（参考图10·12)。近年在电子显微



镜的观察下，已经证实了这一推测。

抗原抗体反应中抗体量在沉淀反应或凝集反应中以效价(titer或称滴度)表示。抗血清的稀释倍数即为效价，常用2的方次表示，即2^1，2^2，2^3……2^n。滴定法有很大的误差，更为精确的定量分析是Heidelberger建立的抗体定量分析，它包括三个步骤，即(1)加入同型抗原；(2)分离和洗涤沉淀；(3)用凯氏定N法或Folin-Ciccalteau法测定沉淀物中的抗体量。

抗原抗体反应技术最普遍的应用是免疫电泳法。抗原抗体

反应也可以在凝胶中扩散形成沉淀线，称为Ouchterlony双向扩散(double diffusion)。这一技术可以测出两种抗原是否相同，甚至可以观察部分决定簇的结合，如图10·13。

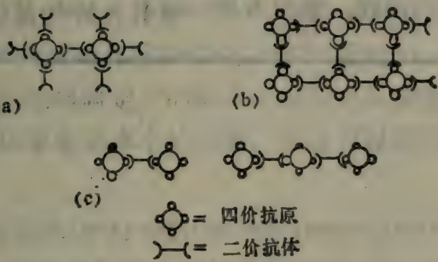


图10·12　抗原抗体复合物形成的示意图

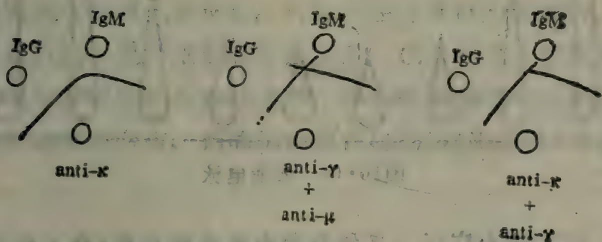


图10·13　Ouchterlony双扩散示意图
a.相同　b.不同　c.部分相同

如以琼脂电泳与双向扩散相结合，即琼脂免疫电泳技术。免疫电泳又有几种不同的方法，如对流免疫电泳(counter immunoelectrophoresis)是因为电场可以限制抗原抗体自由扩散，因而可提高抗原抗体的局部浓度，加速两者移动速度。在合适的抗原抗体比例及一定的离子强度下，在琼脂介质中，抗原加碱性缓冲液带负电荷，电泳时向正极移动，而抗体电荷由于接近等电点，电泳时借内渗透力，可由正极向负极渗透，将反应孔做适

当排列，电泳时Ag-Ab相向移动，二者相遇可形成沉淀线。再如火箭电泳(rocket electrophoresis)是在单向扩散基础上的技术。当抗原在含有单价抗体的琼脂板中泳动后，比例合适时可出现锥形沉淀线，形似火箭，故名火箭电泳(图10·14)。此法

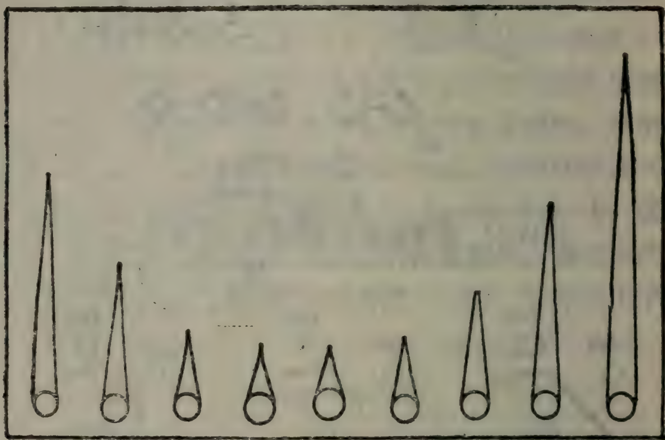


图10·14 火箭电泳

简便，应用较为广泛。又如双向定量免疫电泳(交叉定量免疫电泳crossed electrophoresis)是在琼脂板垂直方向进行二次电泳，第一向电泳是把复杂抗原在琼脂板上展开，切成各抗原条；第二向电泳使已展开的各抗原成分进入含复杂抗体的凝胶板中，相对应抗原抗体结合形成沉淀峰，面积与抗原量成正比，测出面积就可以对抗原进行定量测定。还有一种分辨率较高的聚丙烯酰胺凝胶电泳(圆盘电泳)，这种凝胶孔可以调节控制，可以精确地鉴定抗体。

另外一类是免疫标记技术，最常用的有下列三种：

(1)同位素标记免疫技术。用放射性同位素(^{125}I，^{131}I，

^3H, ^{14}C等)对纯抗原或抗体进行标记，将标记物与抗原或抗体反应，测定其放射性强度，所以又称为放射免疫测定。由标准曲线查出未知标本的抗原或抗体，方法灵敏但条件要求较复杂。

(2)免疫荧光技术，又称荧光抗体技术(Immunofluorescence technique or Fluorescence antibody technique)。用化学方法将荧光素(fluorescein)与抗体结合，但不影响Ag-Ab结合的活性。用荧光抗体处理固定过的标本，在荧光显微镜下观察荧光的出现，可用以鉴定标本中的抗原，并且可以进行抗原的定位。

(3)免疫酶标技术(enzyme labelling immunosorbent assay; 简称 ELSIA)，其原理与荧光抗体技术相似。用酶来标记抗体，最常用的酶为辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)，它与底物发生组织化学反应，可以产生有颜色的沉淀物，在普通光学显微镜下进行细胞水平的追踪，也可在电子显微镜下进行分子水平的观察。反应终止后，标本颜色深浅可以表明酶抗体与抗原结合的多少，用酶标比色计(或光电比色计)可以测得结果。

参考文献

1. Weisman, I. L., Hood, L E. & Wood W. B.: Essential Concept in Immundogy, 1978.
2. Klein, J.: Immunology—The Science of Self-Nonself Discermination, Wiley, 1982.
3. Steward, M. W.: Antibody: Their Structure and Function, Chapman & Hall, 1984.
4. 王亚辉：分子免疫学，科学出版社，1982。

第十一章　血红蛋白与氧的运输

一、引言

成年人体中含有5—6升的血液，其中有1/3—1/2是红细胞(erythrocyte)。红细胞和白细胞(leucocyte)都悬浮在血浆(blood plasma)中。在人体中血液每天要将600升氧从肺部运输到各种组织中去，因为各种组织的细胞都要进行有氧呼吸才能维持生存。例如心脏一旦缺氧即会引起心绞痛。氧对生命是极端重要的，缺氧可以使许多细胞坏死。

血液靠血浆运输O_2的量是极少的。因为在水溶液中O_2的溶解度很小，血液运输的全部O_2几乎都是靠红细胞中的血红蛋白(hemoglobin)运送的，在100ml全血中血红蛋白要结合20ml气态O_2。

正常红细胞的大小为6—9μm，呈双凹盘状(biconcave disc)。红细胞中不含细胞核、线粒体、内质网以及其它细胞器。红细胞是从其前体即网织红细胞(reticulocyte)形成的。在红细胞成熟过程中网织红细胞失去其细胞核及细胞器，形成大量血红蛋白，因此红细胞是不完整的细胞，自己不能再增殖，在人体内生存120天左右。红细胞的主要功能就是携带血红蛋白，血红蛋白溶解于水溶液的胞液(cytosol)中，其浓度很高，可以

达到34%。

在人和哺乳类的动脉中红细胞中的血红蛋白从肺部流到周围的组织中去，这时血红蛋白被O_2饱和，大约可以达到96%，在静脉中血液又流回到心脏中去，这时血红蛋白被O_2饱和的程度只有64%。因此每100ml血液通过组织要放出1/3的O_2，即等于在体温(37℃)下，在一个大气压下放出大约6.5ml的O_2(图11·1)。

血红蛋白不但在人和哺乳类的氧的运输中占有重要地位，而且在植物中也存在血红蛋白。豆科植物的根瘤也含有一种血红蛋白，称为豆血红蛋白(Leghemoglobin)，因此根瘤是红色的。豆血红蛋白最初是我国的王应睐发现的。根瘤中进行固氮的固氮酶是厌氧的，由于豆血红蛋白与氧的亲和力很高，从而给根瘤产生一个厌氧的环境，保证根瘤菌(Rhizobium)中的固氮酶(nitrogenase)能够进行生物固氮作用。

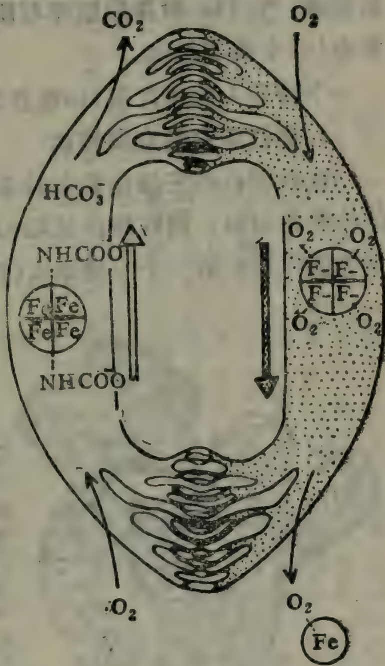


图11·1 血红蛋白在血液循环中运输氧的作用

二、血红蛋白的结构

1. 血红蛋白的一级结构

血红蛋白由四条肽链组成，为四聚体，由两条α链和两条β链组成。α链由141个氨基酸残基组成，而β链由146个氨基酸残基组成，它们的氨基酸顺序与肌红蛋白(myoglobin)很相似，后者由153个残基组成。

下面是人的血红蛋白α链及β链的氨基酸顺序（见215页）。

2. 血红蛋白的空间结构

血红蛋白的三级结构与抹香鲸的肌红蛋白(myoglobin)的结构非常相似。肌红蛋白是Kendrew于1959年用结晶学技术得到的蛋白质的第一个三维结构(图11·2)。潜水脊椎动物如海豹、



图11·2 肌红蛋白的三维结构
(a) 正面 (b) 侧面

α链：

	1				5					10					15	
1	VAL	LEU	SER	PRO	ALA	ASP	LYS	SER	ASN	VAL	LYS	ALA	ALA	TRP	GLY	15
16	LYS	VAL	GLY	ALA	HIS	ALA	GLY	GLU	TYR	GLY	ALA	GLU	ALA	LEU	GLU	30
31	ARG	MET	PHE	LEU	SER	PHE	PRO	THR	THR	LYS	THR	TYR	PHE	PRO	HIS	45
46	PHE	ASP	LEU	SER	HIS	GLY	SER	ALA	GLN	VAL	LYS	GLY	HIS	GLY	LYS	60
61	LYS	VAL	ALA	ASP	ALA	LEU	THR	LEU	ALA	VAL	ALA	HIS	VAL	ASP	ASP	75
76	MET	PRO	ASN	ALA	LEU	SER	ALA	LEU	SER	ASP	LEU	HIS	ALA	HIS	LYS	90
91	LEU	ARG	VAL	ASP	PRO	VAL	ASN	PHE	LYS	LEU	LEU	SER	HIS	CYS	LEU	105
106	LEU	VAL	THR	LEU	ALA	ALA	HIS	LEU	PRO	ALA	GLU	PHE	THR	PRO	ALA	120
121	VAL	HIS	ALA	SER	LEU	ASP	LYS	PHE	LEU	ALA	SER	VAL	SER	THR	VAL	135
136	LEU	THR	SER	LYS	TYR	ARG										150

β链：

	1				5					10					15	
1	VAL	HIS	LEU	THR	PRO	GLU	GLU	LYS	SER	ALA	VAL	THR	ALA	LEU	TRP	15
16	GLY	LYS	VAL	ASN	VAL	ASP	GLU	VAL	GLY	GLY	GLU	ALA	LEU	GLY	ARG	30
31	LEU	LEU	VAL	VAL	TYR	PRO	TRP	THR	GLN	ARG	PHE	PHE	GLU	SER	PHE	45
46	GLY	ASP	LEU	SER	THR	PRO	ASP	ALA	VAL	MET	GLY	ASN	PRO	LYS	VAL	60
61	LYS	ALA	HIS	GLY	LYS	LYS	VAL	LEU	GLY	ALA	PEE	SER	ASP	GLY	LEU	75
76	ALA	HIS	LEU	ASP	ASN	LEU	LYS	GLY	THR	PHE	ALA	THR	LEU	SER	GLU	90
91	LEU	HIS	CYS	ASP	LYS	LEU	HIS	VAL	ASP	PRO	GLU	ASN	PHE	LYS	LEU	105
106	LEU	GLY	ASN	VAL	LEU	VAL	CYS	VAL	LEU	ALA	HIS	HIS	PHE	GLY	LYS	120
121	GLU	PHE	THR	PRO	PRO	VAL	GLN	ALA	ALA	TYR	GLN	LYS	VAL	VAL	ALA	135
136	GLY	VAL	ALA	ASN	ALA	LEU	ALA	HIS	LYS	TYR	HIS					150

鲸、海豚等的肌肉中富含肌红蛋白，肌红蛋白与O_2的亲和力非常大。

肌红蛋白由8条 α- 螺旋组成， 分别 定 名 为A—H。这些α-螺旋靠一些转角连接形成一个珠蛋白(globin)。血红蛋白为四聚体，它的三维结构于1960年由Max Perutz以低分辨率完成。以后于1967年以高分辨率完成了氧合血红 蛋白(oxyhemoglobin)的三维结构。血红蛋白α链及β链的三维结构都与肌红 蛋白非常相似。血红蛋白整个分子具有222对称性，即沿A 轴、B轴和C轴旋转180°角。“αβ对”都与另一“αβ对”相重合。

血红蛋白α链或β链都由8条 α-螺旋组成， 其中包藏一个血红素(heme)分子，血红素分子连在螺旋E与螺旋F之 间。血红素为protoheme IX，其结构如图11·3所示。

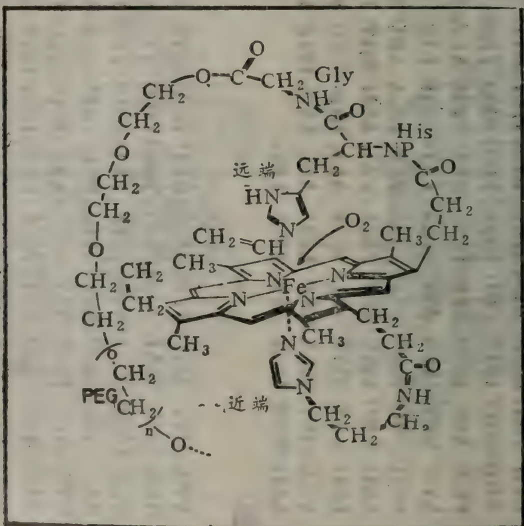


图11·3　血红素分子与O_2的配位

血红素中F_e原子有6个配位键。其中4个配位键与4个吡咯环中的N原子形成配位键。第5个配位键与珠蛋白(globin)的组氨酸残基连接，而第6个配位键则与O_2结合。

在血红蛋白四级结构中，两个α亚基(α_1，α_2)之间或两个β亚基(β_1，β_2)之间的直接接触很少，但是在$\alpha_1\beta_1$(或$\alpha_2\beta_2$)之间的接触点很多，这些接触点很大部分是由氨基酸残基的疏水侧链组成。在四条多肽链之间有一个中央的空隙。

三、血红蛋白与氧的运输

血红蛋白是一个四聚体，分子量为64,500，它的每个亚基能结合一个O_2分子。血红蛋白的主要功能就是从肺部将O_2运输到组织中的微血管，以满足细胞呼吸的需要。在肌肉中肌红蛋白担负着储存氧的功能。虽然肌红蛋白与血红蛋白在三级结构上极其相似，但是它们的生理效应却很不一样。在高氧分压下，肌红蛋白和血红蛋白能结合同样数量的O_2(以重量计)；但在低氧分压下血红蛋白更容易放出氧，这些区别可以用溶液中纯蛋白的氧结合曲线来表示(图11·4)。肌红蛋白的氧结合曲线为双曲线。肌红蛋白中血红素与O_2的结合关系如下：

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons MbO_2 ,$$

形成平衡常数$k_f = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]}$。

如y为肌红蛋白分子饱和的百分数，并以氧分压(pO_2)表示O_2的浓度，则

$$k_f = \frac{y}{(1-y)pO_2} \quad 或 \quad y = \frac{kpO_2}{1+kpO_2} ,$$

这就是双曲线的公式，如图11·4所示。

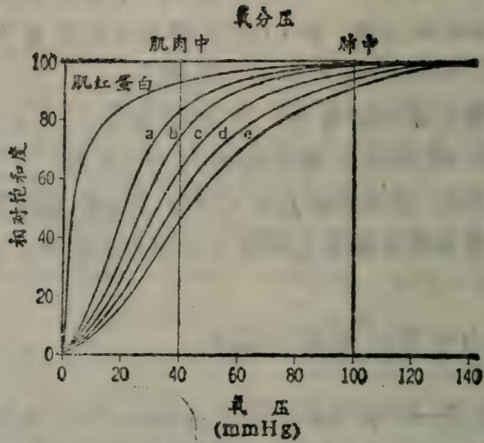


图11·4 溶液中纯蛋白的氧结合曲线

但是血红蛋白的行为则与肌红蛋白不同，它与O_2结合的曲线为S形。其S形曲线可以结合常数表示如下：

$$k_f = \frac{[HbO_2]}{[Hb][O_2]^n} \quad 或 \quad y = \frac{kpO_2{}^n}{1 + kpO_2{}^n}$$

通常n的常数为2.8，这表明血红蛋白中 4 个血红素与O_2分子的结合并不是独立的，而是O_2分子与其中一个血红素的结合会影响到其它 3 个血红素分子。这似乎表示第一个O_2分子的结合亲和力最低，而以后氧与血红蛋白的结合则具有更高的亲和力。$n>1$时表示小分子配位键间具有协同效应。

血红蛋白对氧的协同结合作用(cooperative interaction)很适于使之作为氧的运载体。在肺中氧分压很高（100mmHg)，血红蛋白可以被氧饱和。而在其它组织中，氧分压很低(40mm Hg)，血红蛋白可以放出半数的氧。如用肌红蛋白当作氧的运载体，在同样情况下只能放出10%的氧。

四、血红蛋白与H^+及CO_2的运输

血红蛋白除运输氧气外，还能将细胞呼吸产生的两种产物H^+及CO_2从各种组织运到肺部及肾脏。

在动物组织中有机燃料被线粒体氧化成CO_2，而CO_2又在碳酸酐酶（carbonic anhydrase）的作用下生成碳酸：

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

碳酸是一个弱酸，能解离成H^+及HCO_3^-，从组织到肺部和肾脏血红蛋白还携带着20%的H^+及CO_2。

血红蛋白与O_2的结合受pH及CO_2浓度的影响，在周围组织中低pH及高CO_2的情况下，血红蛋白与O_2的亲和力下降。反之，在肺部微血管中，因为CO_2被释放，血液的pH上升，血红蛋白对O_2的亲和力又增加。pH及CO_2浓度对血红蛋白与O_2的结合及释放的效应，称为Bohr效应（Bohr effect）。Bohr是丹麦的生理学家。

血红蛋白与O_2结合可写成：

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2。$$

按照Bohr效应应写成：

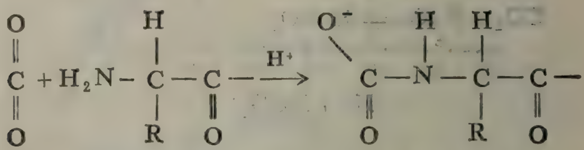
$$HHb^+ + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + H^+。$$

这个公式表明H^+浓度对血红蛋白饱和曲线的影响。

O_2与H^+都能与血红蛋白结合，但是结合的方式相反。当O_2浓度高时（在肺中），O_2与血红蛋白结合，H^+被放出。当O_2浓

度低时（在各种组织中），H^+与血红蛋白结合。但是O_2与H^+并不是在血红蛋白的同一部位上结合，O_2结合在血红素的Fe原子上，而H^+结合在球蛋白β链的His146残基上及α链的两个其它残基上。

CO_2也能与血红蛋白结合，它的结合部位是血红蛋白四条肽链的每个链的N末端，形成氨甲酰血红蛋白（carbaminohemoglobin）：

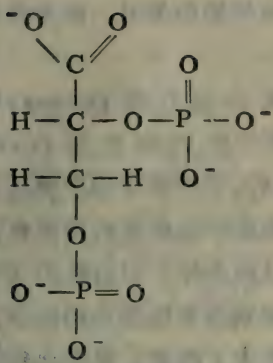


N末端残基　　　　氨甲酰末端残基

血红蛋白一方面能与O_2结合，另一方面能与H^+及CO_2结合，这种相反的关系对动物机体是很有利的。在组织中，低pH及高CO_2浓度有利于O_2从血红蛋白中释放出来。而在肺中，高浓度的O_2则有利于释放H^+及CO_2，并且与O_2结合。因此，血红蛋白非常适应于O_2、CO_2及H^+的运输。

此外，血红蛋白还有第四个配位体，即2,3-二磷酸甘油酸（2,3-diphosphoglycerate，简称DPG）。在红细胞中DPG的浓度很高，但是它的功能一直不清楚。现在我们已经阐明DPG与血红蛋白对O_2的亲和力有关。如在纯血红蛋白溶液中加入DPG，就会大大降低它对O_2的亲和力。DPG的这种效应是由于它本身被脱氧血红蛋白结合，我们可以用血红蛋白的第四个平衡式来表示：

$$HbDPG + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + DPG。$$



2,3-二磷酸甘油酸(DPG)

血红蛋白与O_2的结合及其与DPG的结合成负相关。DPG调节红细胞对O_2的亲和力随肺部氧分压而改变。如果一个人在几小时内从海平面移到海拔4000米高的地方，则红细胞中DPG含量升高，使更多DPG与血红蛋白结合，因而血红蛋白与氧的亲和力即下降。在海拔高的地方氧分压比海平面低很多，因而人的组织中的氧分压亦低。在海拔高处增高DPG使血红蛋白更容易释放氧到组织中，反之在海拔低处血液中DPG的含量降低。

血红蛋白分子在何处与DPG结合？研究发现，血红蛋白有一中央空穴或通道，在此空穴中有许多带正电荷的R基团，这就是DPG的结合部位。当与O_2结合时，DpG从空穴被取代出来。有些鸟类的红细胞不含DPG，但是含有另一些磷酸化合物，即六磷酸肌醇，它在降低血红蛋白的氧亲和力上比DPG更强。

五、血红蛋白的构象变化

由于Perutz等人对血红蛋白的晶体学的深入研究，现在已经使我们能够了解血红蛋白分子在运输O_2的过程中的变化，从

分子水平揭示了血红蛋白结构与功能的关系，成为分子生物学的重要成就。

与氧结合的血红蛋白称为氧合血红蛋白（oxyhemoglobin），不与氧结合的血红蛋白称为脱氧血红蛋白（deoxyhemoglobin）。血红蛋白与氧结合后，它的构象确实发生了变化。

Perutz最初测定血红蛋白构象时是测定的脱氧血红蛋白，是在无氧条件下培养出血红蛋白的晶体。以后他们在有氧条件下培养出血红蛋白的晶体。测定氧合血红蛋白的构象，发现血红蛋白与氧结合后，它的构象发生了改变。氧合血红蛋白与脱氧血红蛋白的三维结构不一样。血红蛋白四聚体由两个相同的二聚体（$\alpha_1\beta_1$及$\alpha_2\beta_2$）组成，在二聚体中亚基紧密结合，血红蛋白的αβ链的三级结构在氧合血红蛋白及脱氧血红蛋白中并没有什么不同。但是血红蛋白与氧结合后，它的四级结构发生了改变，血红蛋白的两个二聚体能够彼此相对移动。氧合血红蛋白分子比脱氧血红蛋白分子更加紧密。中央空腔更小些。

在氧合血红蛋白中，两个β链变得更加靠近，而在脱氧血红蛋白中两个β链彼此离开较远。当血红蛋白与氧结合时，其“$\alpha_1\beta_1$对”改变它与“$\alpha_2\beta_2$对”的相对位置，转移的角度达到15°，这种构象变化可从图11·5看到。当血红蛋白失去氧时，它又缓慢地移动改变其构象。血红蛋白与氧结合时的构象变化可能与氧饱和时的S形曲线有关。

六、异常血红蛋白

血红蛋白分子结构比较复杂，非常适应氧的运输。但是，有一些异常血红蛋白（abnormal hemoglobin）不能像正常血红蛋白一样运输氧气。因此研究异常血红蛋白，了解它们如何

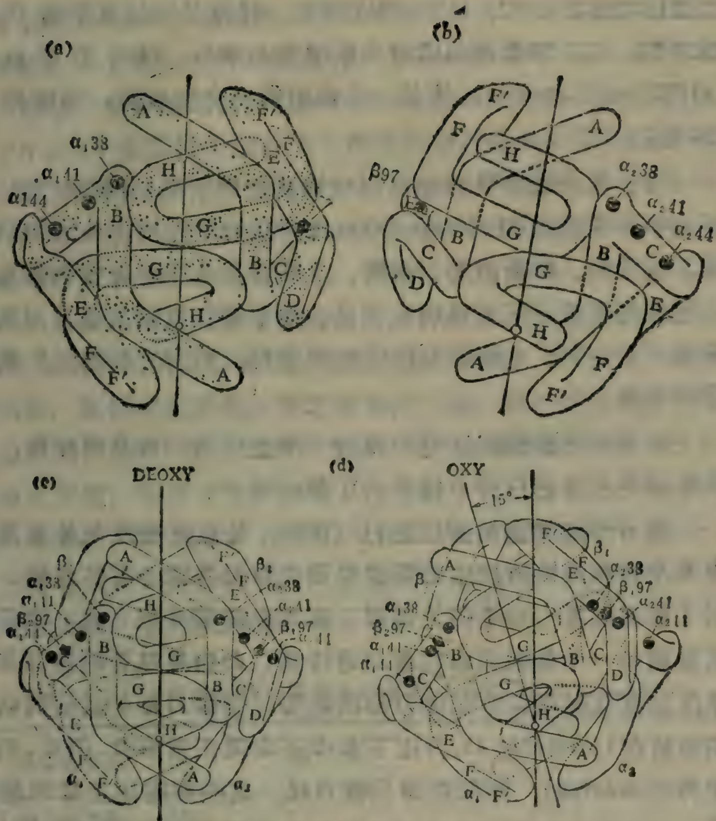


图1·15 血红蛋白中亚基的运动

(a) $\alpha_1\beta_1$二聚体 (b) $\alpha_2\beta_2$二聚体

(c) 血红蛋白四聚体的脱氧形式

(d) 氧合血红蛋白，$\alpha_1\beta_1$相对$\alpha_2\beta_2$旋转15°。注意在新位置中β97处于α41与α38之间

产生缺陷，并且这些缺陷如何影响血红蛋白分子的性质，这样我们就可以更好地了解蛋白质结构与功能的关系。

引起贫血病或其它病理症状的血红蛋白的缺陷可以分为三类：(1) 转录或加工成信使RNA时受到破坏，以致不能合成

珠蛋白的肽链；(2) DNA的点突变，导致多肽链氨基酸残基的改变；(3) 珠蛋白基因组片段的完全缺失。镰刀形贫血病(sickle cell anemia) 就是一个典型的点突变疾病，下面再详加讨论。

由于基因缺失导致珠蛋白α-链或β-链缺陷，分别称为α-及β-地中海贫血病(thalassemias)，此病在地中海沿岸各国如西班牙、意大利、南斯拉夫、希腊、土耳其及北非各国特别常见。在这些地区镰刀形贫血病也常见。地中海贫血病及镰刀形贫血病在中国南方、东南亚及印度也曾发现，所有这些地区疟疾都是常见病。

地中海贫血病的研究使我们了解血红蛋白的基因结构，但是对这些血红蛋白分子结构的了解却很少。

镰刀形红细胞的血红蛋白 (HbS) 是点突变及氨基酸顺序中某个残基改变所产生的病患中研究得最多的一种贫血病。这对了解血红蛋白分子的关键部位及非必要部分很有用。镰刀形贫血病是一个典型的血红蛋白遗传病。此病最显著的特点是在氧压浓度低时细胞有呈镰刀形的趋势。患镰刀形贫血病的病人的血液在100mmHg O_2分压下多少还表现正常形状。但是，当氧压为40mmHg时，红细胞即呈镰刀状。这些细胞比正常细胞变形，并且具有刚性，在微血管中流动时常被绊着，引起痛苦和发炎。在氧气充足时，多数镰刀形细胞可以重新恢复正常形状，但其中一定数量会受到膜的损伤，并变成不可逆的镰刀形细胞(ISC)，这些有缺陷的细胞容易破碎，并且平均寿命比较短，使病人贫血并给骨髓的造血机能以沉重的负担。

Linus Pauling于1949年指出镰刀形贫血病是由于血红蛋白分子发生缺陷引起的，他称之为分子病(molecular disease)。6年后 Ingram 用电泳技术确切证明：在血红蛋白的四聚体中沿

着每条β链的第6位氨基酸残基不像正常链那样为谷氨酸，而是缬氨酸，一个带负电荷的侧链被一个疏水侧链所代替。这种改变了的分子称为血红蛋白S(hemoglobin S)。为什么血红蛋白分子中574个氨基酸中仅有两个改变就会产生如此剧烈的效应成为镰刀形状呢？在红细胞中血红蛋白分子的浓度是极高的（340mg/ml），以致可以说在正常情况下它们接近晶体。$\alpha_2\beta_2$四聚体的大小为65×55×50Å，平均相距只有10Å，它们可以旋转并且彼此流过去而无任何阻碍。而在镰刀形红细胞表面上β链6位上的负电荷被油状的疏水残基所取代，即增加了溶液的粘度，降低其溶解度，使之聚集在一起。缺氧时这些有缺陷的血红蛋白S分子聚集成长纤维状，并且它们集合成束，它们使溶液变硬，即成为长形的镰刀状细胞。镰刀形细胞中的束状血红蛋白，常排列成正方形或六角形，与中心平均相距220Å。它们聚合成椭圆形的横切面，沿轴有一定的扭曲，使纤维具有螺旋状外观，但宽度则不一致。

表11.1　点突变导致的异常血红蛋白（摘自Dickerson，1983）

氨基酸残基	变　化	名称
I.镰刀形细胞——β链		
6(A3)	Glu→Val	S
6(A3)	Glu→Lys	C
121 (GH4)	Glu→Lys	O Arab,Egypt
II.血红蛋白 M		
A α链		
58 (E7)	His→Tyr	M Boston,Mosaka
B β链		
28 (B10)	Leu→Gln	St.Louis
63 (E7)	His→Pro	Bicetre

异常血红蛋白除上述镰刀形贫血病外，还有许多种异常血红蛋白，如由于肽链中插入脯氨酸而使α-螺旋中断；由于氨基酸侧链太小而造成困难；在分子中引入一个带电荷的或极性基团；最近还有单个氨基酸残基或一段肽链的缺失而使分子失去稳定性。除由血红蛋白S造成的镰刀形贫血病外，还有一些其它异常血红蛋白分子病，现在选择几种列于表11·1，以见一斑。

参考文献

1. Dickerson, R. E. & Geis, I.: Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology, Benjamin, 1983.
2. Lehninger: Principles of Bioechmistry, Worth, 1982.

第十二章　叶绿素蛋白与光能的转换

一、引言

光合作用（photosynthesis）是绿色生物的特殊功能，它能将日光的光能转化为化学能，将CO_2和水转变成有机物，主要为碳水化合物。光合作用在绿藻或绿色植物的叶绿体（chloroplast）上进行，而光合细菌则在载色体（chromophore）上。光能的吸收和转化则是在叶绿体的类囊体膜(thylakoid membrane）上进行的。

在绿色植物和绿藻的类囊体膜上存在两种光系统——即光系统I（photosystem I，PSI）和光系统II（photosystem II，PSII)，而光合细菌只含有光系统IO。光系统I与CO_2的还原有关，而光系统II则与放O_2有关。在光系统I上存在着反应中心（reaction center)，在反应中心上叶绿素（chlorophyll)分子起着光能转换（energy transducer）的作用，在反应中心上叶绿素分子成对存在，即二聚体（dimer)，它能接受捕光色素天线(light-harvesting antenna）所捕获的光量子，然后供给受体一个电子，结果就引起电荷的分离（charge separation)，于是产生化学能（以Chl代表叶绿素），

$$ZchlQ \xrightarrow{h\nu} ZChl^{*}Q \longrightarrow Z^{+} + Chl + Q^{-}$$

Z、Q分别代表电子供体和受体。光系统I包含有反应中心（含P_{700}）、捕光色素天线及各种电子载体（如醌、FeS蛋白、细胞色素等），它们存在于特殊的光合膜上。光系统II的反应中心含有P_{680}，及含Mn的蛋白，但这种Mn蛋白的结构和性质还不清楚。

光合作用过程中光能传递的效率极高，这是由于天线色素分子彼此在空间有适当的定向排布，其空间距离不超过70Å，也不小于10Å，现在已经确切地证明，这些色素分子是与蛋白质分子以非共价键结合的，就象其它卟啉类（porphyrins）那样，在血红蛋白及各种细胞色素中与蛋白质相结合。

二、叶绿素蛋白的分离和纯化

在类囊体上叶绿素蛋白（chlorophyll-protein）与由脂质组成的生物膜结合在一起，因此要想从绿色植物叶片中提取叶绿素蛋白，首先要用去污剂（如Triton X-100，十二烷基硫酸钠Na Dod SO_4）去掉脂质，使叶绿素蛋白溶解。Thornber（1966）与Ogawa等（1966）分别将用去污剂溶解的叶绿体膜用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）进行分离，得到三条绿色区带，他们分别定名为叶绿素蛋白复合物I，II，III（简称CPI，CPII，CPIII）（图12·1）。经测定CPI含有P_{700}，属于PSI，占叶绿素总含量的10—18%；CPII为捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体（light-harvesting chlorophyll a/b protein complex），简称LHCP，占叶绿素的40—60%；CPIII 为游离叶绿素（free chlorophyll），简称 FC，占 22—50%。

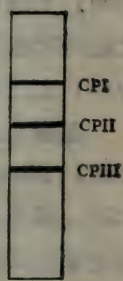


图12·1 叶绿体蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

以后许多科学工作者改进了叶绿素蛋白的提取分离等电泳技术，FC逐渐减少，又分离出许多种叶绿素蛋白，图 12·2为Anderson等（1978）用$NaDodSO_4$:Chl＝10:1提取菠菜叶绿素蛋白，然后经过温和的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳，可以得到6种叶绿素蛋白，即CPⅠ,CPⅠa, CPa, LHCP1,LHCP2和LHCP3。(图12·2)

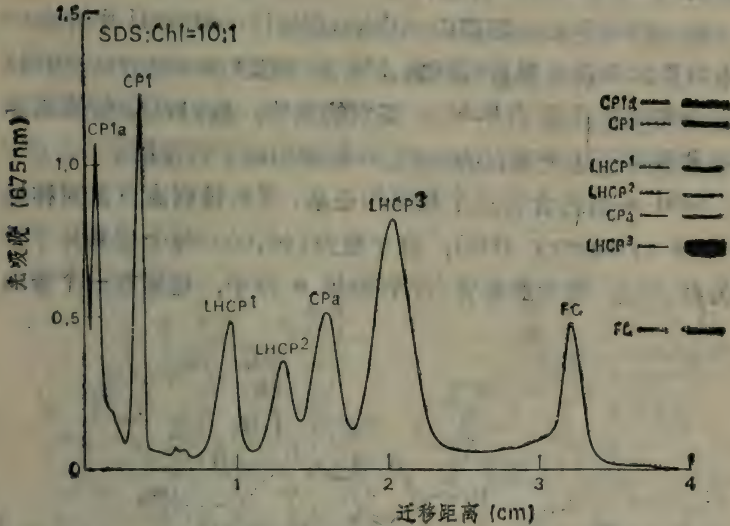


图12·2　菠菜叶绿体膜中的叶绿素蛋白

经过光谱测定CPⅠ及CPⅠa含有P_{700}，为PSI的反应中心，其叶绿素占总量的25%；LHCP1，LHCP2,LHCP3为捕光色素蛋白复合物，所含叶绿素共占54%；CPa为PS Ⅱ的反应中心，所含叶绿素占10%；FC占11%。随着叶绿素蛋白质提纯技术的进一步改进，FC还会减少，Thornber认为叶绿素大概都是与蛋白质结合的。目前经过国内外各单位研究，各种高等植物如大麦、

小麦、玉米、高粱、凤眼莲、大豆等叶绿体中的叶绿素蛋白都已分别提取出来，并进行了各种光学鉴定。

三、叶绿素蛋白的结构

1.绿色光合细菌中的细菌叶绿素a蛋白（bacterio chlorophylla protein）的结构

在一种绿色光合细菌Prosthecochloris aestuarii 中存在一种水溶性的细菌叶绿素a蛋白。Matthews及Fenna(1975—1979)经过分离纯化获得了 Bchl a-蛋白的晶体，他们以X-射线晶体学技术取得了这个蛋白的2.8Å分辨率的电子密度图。

Bchl a-蛋白含有三个相同的亚基，紧密排列成三重对称轴(3-fold symmetry axis)，分子量为140,000，每个亚基分子量约为42,000，每个亚基含有7个 Bchl a 分子，包围在一个蛋白

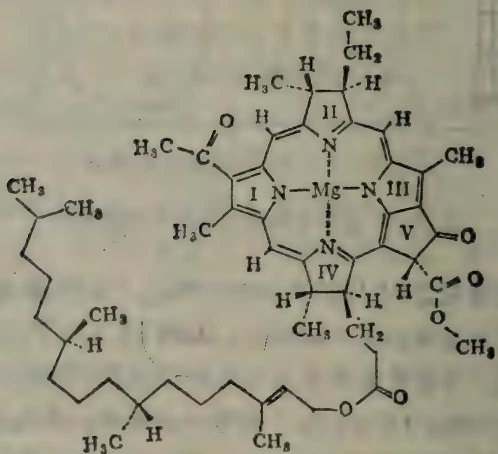


图12·3 细菌叶绿素a的分子结构

质"袋"中。此多肽链形成由15个β折迭片组成的一层，在中心区形成平面，而两端扭曲，其上并有6段α-螺旋。在每个亚基中7个Bchl a的叶醇（phytyl）侧链头尾相接触，这些碳氢链组成分子内部的疏水核心，它在形成B chl a蛋白复合物中可能很重要，在蛋白质与Bchl a 的头与尾之间也有接触，这7个镁原子都似乎是五配位的，其配基为组氨酸的侧链(图12·3及图12·4)。

在低温中，Bchl a-蛋白的吸收光谱及圆二色谱（circular dichroism spectrum）都表现极快，可能是由于这7个载色体之间的激子(exciton)的相互作用的缘故，他们认为Bchl a-蛋白可以看作是在生物体中叶绿素组织的一个模型。这里所看到的叶绿素与蛋白质之间的相互作用可能也存在于其它叶绿素蛋白中。

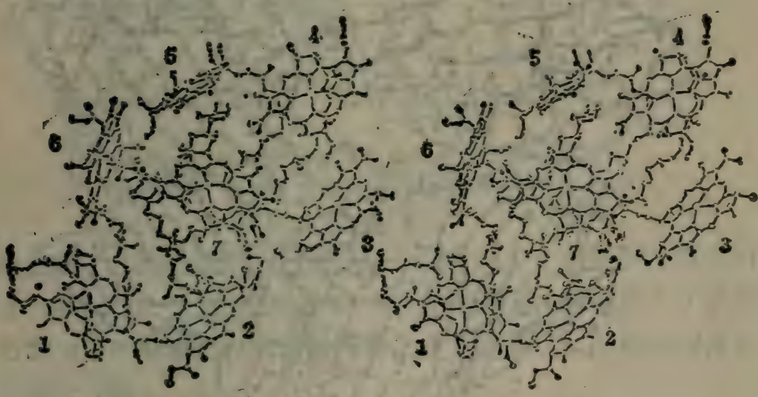


图12·4　细菌叶绿素a分子的首尾相接图

2.绿色植物的叶绿素蛋白

绿色植物的叶绿素蛋白虽然已经分离出来，但是它们的三维结构迄今了解得极少，下面分别叙述它们的结构的一些情况。

(1) CPI。CPI为构成光系统I的反应中心的重要成分，其分子量为100,000，这个蛋白质的末端分析表明，其N末端分别为丙氨酸及天冬氨酸，因此，它是由两个相同的分子量为50,000的亚基所组成。CPI含有P_{700}，P_{700}是一种叶绿素a的二聚体，叶绿素/P_{700} = 40/1—120/1。光系统I的反应中心为一个叶绿素a二聚体，被一层由10—20个长波叶绿素a分子(chl a 685nm)包围，而其外层又被一层叶绿素分子所包围。

最近Fish，Klick与Bogorod（1985）从玉米叶绿体中分离出编码光系统I中的含P_{700}的叶绿素 a 蛋白（即CPI）的基因，

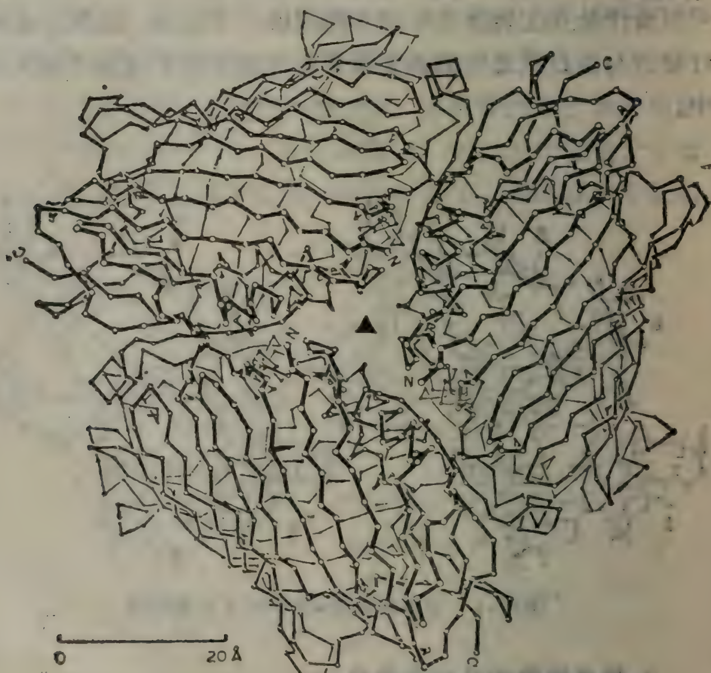


图12·5 细菌叶绿素a蛋白三聚体的空间结构
(Matthews等，1979)

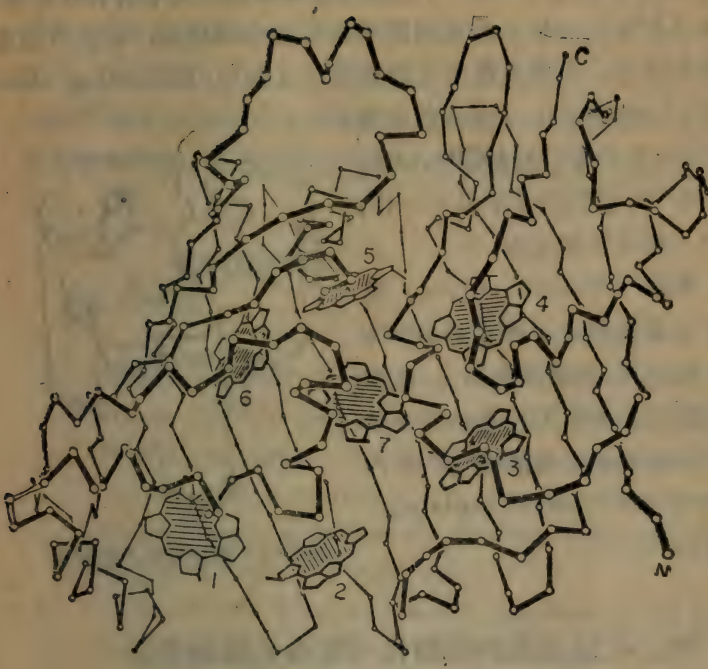


图12·6 细菌叶绿素蛋白的一个亚基的空间结构
(其中有7个细菌叶绿素分子，Matthews 等，1979)

并测定了其核苷酸顺序。此基因共含有4552个核苷酸，除去内含子等以外，共编码CPI 750 个氨基酸残基，这是迄今了解到的第一个叶绿素蛋白氨基酸顺序。至于它的二、三级结构目前尚毫无了解。

(2) CPa(或CPN)。CPa为光系统II的反应中心的叶绿素a蛋白质，其分子量为40—45kd，吸收光谱最高峰为670nm。蔡南海等(1979)将CPa分离成二种组分，其中之一含有PSII的反应中心色素，即P_{680}，另一种组分是围绕它的天线叶绿素蛋白。

（3）LHCP。LHCP 为捕光叶绿素蛋白，其中含有叶绿素a及b，Chla/b = 1:1。此蛋白没有反应中心的功能，只具有吸收光能的作用，故称为捕光叶绿素蛋白（light harvesting chlorophyll protein）。大麦、菠菜等的LHCP分为三种，即LHCP1，LHCP 2，LHCP3，它们的分子量不一样，为30,000道尔顿左右。

最近 kührandt（1984）用电子显微镜测定了豌豆的 LHCP 的三维结构，分辨率为16 Å，此三维结构图表明LHCP 是由三个结构相同的亚基组成的跨膜蛋白（transmen berane protein），见图12·7。

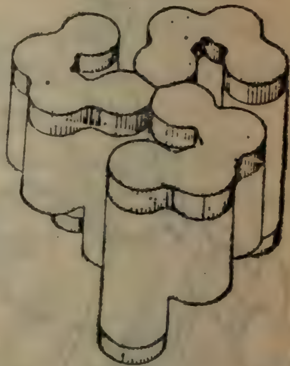


图12·7　豌豆LHCP的结构

四、叶绿素蛋白的结构与吸收光能的关系

虽然高等植物的叶绿素蛋白复合物的三维结构及其在光能转换中的作用尚不了解，但是光合细菌的细菌叶绿素蛋白的研究给我们不少启发。大多数寡聚蛋白都具有二重轴的对称结构，但是细菌叶绿素蛋白则具有环式三重轴对称（3-fold symmetry）。三重轴对称是组装紧密的平面排列的最合适结构，细菌叶绿素蛋白的三重对称表明这个蛋白紧密结合成平面状，并与含有反应中心的质膜相靠近。由于这个蛋白的亚基具有三重对称的结构，在每个细菌叶绿素蛋白的三聚体内部的21个叶绿素分子就沿着三重轴连成一片，使之可以在很广的角度内具有捕捉光能的能力。

高等植物的捕光叶绿素蛋白（LHCP）最近被证明也是三聚体，也具有三重对称的结构，不过它的精细结构尚有待进一步研究，目前还不了解其中叶绿素分子的排列状况。我们知道，LHCP 也具有收集光能的功能，很可能具有与细菌叶绿素蛋白相类似的结构，以便很有效地从广泛的角度捕捉光能，进行光合作用。

参考文献

1. Matthews, B.W.et al.: Structure of a Bacteriochlorophylla--protein from the Green Photosynthetic Bacterium Prosthecochloris Aestuarii J. Mol. Biol., 131:259—285, 1979
2. Thornber, J. P. & Markwell, J. P.: Phorosynthetic Pigment-protein Complexes in Plant and Bacterial Membrane, Trend Biochem Sci. May 122—125., 1981.
3. Kühlbrandt, W.: Three-dimensional Structure of the Light-harvesting Chlorophyll a/b Protein Complex, Nature 307: 478—480, 1984。
4. Fish, L. E., Klick, U., & Bogorod, L.: Two Partially Homologous Adjacent Light-inducible Maize Chloroplast Genes Encoding Polypeptides of the P_{700} Chlorophyll a-Protein Complex of Photosystem I,, J. Biol. Chem. 260:1413—1421, 1985.

第十三章　糖蛋白与细胞识别

一、引言

糖蛋白（glycoproteins）是与碳水化合物结合的一类蛋白质。由于糖蛋白与细胞识别（cellular recognition）有密切关系，近年来研究发展很快。据统计仅从1976年至1982年全世界共发表糖蛋白论文20,000多篇，平均每年2千篇以上。

糖蛋白与农业和医学都有关系。如植物授粉的不亲和性、豆科植物与根瘤菌的相互关系、病原菌与寄主的相互关系，都与糖蛋白有关。与医学有关的如血凝素（hemagglutinin）能使红细胞凝集。外源凝集素（lectin）或植物血凝素（phytohemagglutinin,PHA），这一类凝集素最早是从蓖麻及豆科植物种子中提取出来的，如伴刀豆球蛋白A（concanavalin A，简称Con A），麦胚凝集素（wheat germ agglutinin，简称WGA）、蓖麻蛋白（ricin）等，能使红细胞凝集在一起。以后发现其它植物如水仙、鸭跖草、病毒、真菌以及无脊椎动物（如蜗牛），脊椎动物中也存在凝集素。现在发现的凝集素已达1000多种。

利用外源凝集素凝集血球的作用可以作为探针（probe）鉴别肿瘤细胞膜与正常细胞膜的区别。正常细胞在体外变成恶性细胞（即肿瘤细胞）后，能被低浓度的伴刀豆球蛋白（Con A）

凝集，其浓度往往比正常细胞低10—20倍。细胞被Con A凝集的能力与生成肿瘤的能力有一定的关系。

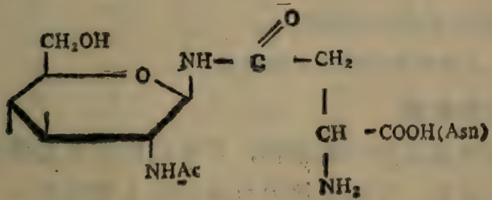
凝集素的凝集性质是由红细胞表面的糖基与凝集素的结合决定的，可以区别血液的血型。凝集素还有刺激细胞进行有丝分裂的作用，称为有丝分裂原（mitogen）。

二、糖蛋白的结构

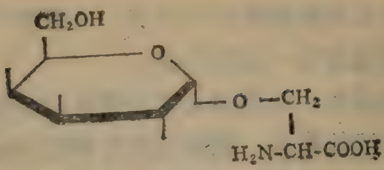
糖蛋白由碳水化合物和蛋白质两部分组成。碳水化合物含有各种单糖如甘露糖（mannose）、葡萄糖（glucose）、半乳糖（galactose）、岩藻糖（fucose）、N-乙酰葡萄糖胺（N-acetylglucosamine）、N-乙酰半乳糖胺（N-acetylgalactosamine）、木糖（xylose）、阿拉伯糖（arabinose）等。现将碳水化合物和蛋白质的结构分别予以讨论。

1.糖链结构

糖蛋白中的糖分子通常形成糖链（sugar chain），各种单糖以一定的连接方式连接成糖链。糖链与蛋白质的连接有两种方式：（1）糖链以N-糖苷（N-glycoside）与蛋白质上的天冬酰胺（Asn）连接；（2）糖链以O-糖苷（O-glycoside）的方式与蛋白质上的丝氨酸（Ser）或苏氨酸（Thr）连接，如下式：



N—糖苷



O—糖苷

动物的糖蛋白中两种糖苷同时存在，而植物的糖蛋白中则只有一种，或为N-糖苷，如豌豆β球蛋白（legumin）、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase）都是N-糖苷，而麦胚凝集素则为O-糖苷。

在动植物细胞的生物膜上存在糖蛋白，这些蛋白质中的碳水化合物以聚糖（glycan）形式存在，它们通常带有分枝，呈二天线（biantennary）、三天线或四天线的形式。这些聚糖的分子结构很复杂，单糖分子有一定的排列顺序，下面是利马豆凝集素（lima bean lectin）及人胃液中的粘蛋白的糖链结构：

$$
\begin{array}{llll}
\text{Man} \xrightarrow{\alpha 1;2} \text{Man} & & \text{Fuc} & \\
\quad\quad\quad\ \downarrow \alpha 1.6 & & \downarrow \alpha 1.3 & \\
\quad\quad\quad\ \text{Man} & \xrightarrow{\beta 1;4} \text{GluNAC} & \xrightarrow{\beta 1;4} \text{GluNAC} & \rightarrow \text{Asn} \\
\quad\quad\quad\ \uparrow \alpha 1.3 & & & \\
\quad\quad\quad\ \text{Man} & & &
\end{array}
$$

利马豆凝集素的糖链

$$
\begin{array}{l}
\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GluNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc} \rightarrow \text{Ser(Thr)} \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad 6 \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \uparrow \\
\qquad\quad \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GluNAc}\beta 1
\end{array}
$$

人胃液中的粘蛋白的糖链

2.蛋白质的结构

首先讨论糖蛋白的一级结构，目前已经有大量糖蛋白的氨基酸顺序测定出来，下面是伴刀豆球蛋白A亚基的一级结构（图13·1）。

```
                   10                  20                   30
A D T I V A V E L D T Y P N T D I G D P S Y P H I G I D I K
                   40                  50                   60
S V R S K K T A K W N M Q D G K V G T A H I I Y N S V D K R
                   70                  80                   90
L S A V V S Y P N A D A T S V S Y D V D L N D V L P E W V R
                  100                 110                  120
V G L S A S T G L Y L E T N T I L S W S F T S K L K S N S T
                  130                 140                  150
H Q T D A L H F M F N E F S K D Q K D L I L Q G D A T T G T
                  160                 170                  180
N G N L E L T R V S S N G S P E G S S V G R A L F Y A P V H
                  190                 200                  210
I W E S S A T V S A F E A T F A F L I K S P D S H P A D G I
                  220                 230
A F F I S N I D S S I P S G S T G R L L G L F P D A N
```

图13·1 伴刀豆球蛋白A亚基的一级结构

关于糖蛋白的空间结构目前了解的很少。对伴刀豆球蛋白A的X-射线衍射研究表明，Con A的分子由两组反平行β-折迭层组成。Con A 分子结合两个金属原子 Mn^{++}及Ca^{++},二原子相距很近(相隔4.6Å)，包在一个八面体配位的壳中。与糖结合的部位存在于靠近 Ca^{++}及Mn^{++} 部位的浅袋之中。Con A的结合部位对甘露糖残基是互补的，并且也结合葡萄糖和N-乙酰葡萄糖胺(图13·2)。



图13·2 伴刀豆球蛋白A的三维结构

麦胚凝集素是由164个氨基酸残基组成的多肽链。此分子包括四个明显的结构域A、B、C、D。每个结构域由41个残基组成，这41个残基形成一个α-螺旋和一组反平行β-折迭层。WGA分子富含半胱氨酸残基，每分子含有16个二硫键（图13·3)。

许多凝集素分子都是四聚体，如蚕豆（Vicia cracca)凝集素、菜豆凝集素等都是由4个分子量各为33,000的亚基组成的四聚体。红肾豆凝集素有五种同种凝集素(isolectins),这是因为每种同种凝集素是分子量为115,000的四聚体,由两种不同的亚基组成,分别称为白细胞敏感的(L) 及红细胞敏感的（E）两类。因此，它们共有五种组合，即：L_4，L_3E，L_2E_2，LE_3，E_4。L对淋巴细胞表面受体亲和力高，而对红细胞无亲和力,E对与凝集红细胞的性质有关。

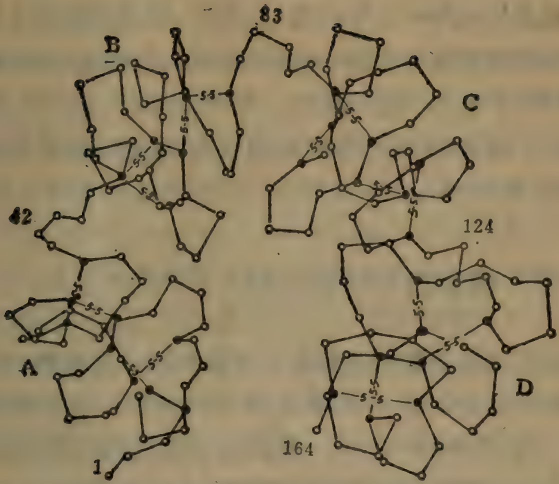


图13·3　麦胚凝集素的结构



图13·4　流感病毒神经氨酸酶的四聚体的三维结构

最近Varghese 等(1983) 用X-射线衍射技术研究了流感病毒的抗原神经氨酸酶(neuraminidase)糖蛋白的结构,这类糖蛋白的分子也是一个四聚体。每个单位由6组β-折迭片组成,每组折迭片包含4条反平行β-折迭结构,这些β-折迭形成螺旋浆式的排列(图13·4)。

三、糖蛋白与受精作用

糖蛋白的最重要功能就是细胞识别。生物的一个重要特性是它能够识别自己(self)和非己 (nonself)。例如在动物的受精作用 (fertilization) 中,卵能够识别自己的精子和外来的精子,自己的精子被接受而外来的精子则被排斥。

藻类和真菌的细胞识别系统比较简单,也研究的比较透彻。例如,衣藻 (chlamydomonas) 在缺乏营养物时,营养细胞则转变成配子,配子有两种交配类型,即 (+) 和 (-) 。只有不同性别的配子相遇时,才发生凝集,细胞融合后产生合子。同种的相同性别的配子或不同种的配子都不能融合。Wiese(1974)证明,从 (+) 细胞得到的物质能使 (-) 细胞凝集,而从 (-) 细胞得到的物质能使 (+) 细胞凝集,这种物质称为isoagglutinin,已经证明其中含有糖蛋白。它们不但有性别专一性,而且具有种的专一性。

近年来由于发育生物学的蓬勃兴起,对动物受精作用中精子与卵的相互识别过程进行了大量研究,取得了很大的进展。

海胆 (sea urchin) 的受精作用表现出高度的种的专一性。不同种的精子与卵的组合都不能受精。当精子与卵相遇时,围绕卵的胶体使精子发生顶体反应 (acrosome reaction) ,存在于精子前端的顶体颗粒与精子质膜相融合,结果导致顶体

(acrosome)颗粒的排出。同时，顶体下面的肌动蛋白聚合成微丝（microfilament），将顶体推出。在有些无脊椎动物中其微丝可长达80μm。Segall等（1979）发现卵胶体中诱导顶体反应的组分为一种硫酸化的岩藻糖多糖，它是卵胶体的主要成分。精子表面受体能够识别同种的岩藻糖高分子。Lopo等（1980）从球海胆（*Strongvlocentrotus nurparatus*）精子分离出它的表面组分，经过鉴定为两种糖蛋白，分子量分别为64kd和84kd，用电泳纯的糖蛋白注射家兔得到抗体，两种糖蛋白的抗体都能使精子凝集。这两种抗体均匀地分布在整个精子表面。这两种抗血清表现出种的专一性。球海胆属中的三个种之间有轻微的交叉反应，而与另一属海胆*Lytechinus pictus*精子之间则无交叉反应。将精子与抗84kd的抗体片段保温培养，完全抑制卵胶诱导的顶体反应，从而抑制受精作用。

海胆卵的表面上含有能与精子结合的受体。如将精子预先用卵胶体诱导顶体反应，则受体能与精子结合，这种结合具有种的专一性。受体与精子结合后能与卵进行竞争，因此卵受精作用受到抑制。由图13·5可见，增加同源受体的组分，差不多完全抑制*S.purpuratus*卵的受精作用，反之从*A.punctalata*得到的受体对*S.purpuratus*精子毫无影响。

Lennarz（1979）用蛋白酶处理海胆卵，可以从卵表面释放出一种含碳水化合物的糖肽，经过凝胶过滤所得到的糖肽中含有已糖，以后他们（1981）又从海胆卵表面分离出一种高分子量的糖蛋白，用凝胶过滤及亲和层析纯化，它的分子量超过1,000,000。他们证明这种卵表面的糖蛋白能凝集结合蛋白(biadin)颗粒。这种糖蛋白含有岩藻糖、木糖、半乳糖及核糖。这种糖蛋白是以结合蛋白为桥梁使卵凝集的最强的抑制剂。

在哺乳动物的精子与卵的关系上近年来也证明与糖蛋白有

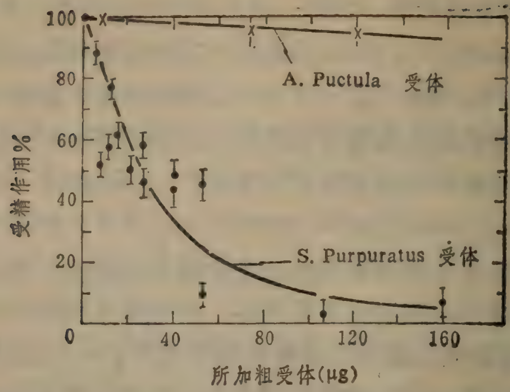


图13·5 海胆卵的受精作用被受体的抑制
（受体分别从*A.punctulata*及*S.purpuratus*提取得到）

关。Wasserman 等（1981）研究了小鼠的透明带（zona pellucida 简称Zp），它起着细胞识别作用，能使卵同具有种专一性的精子结合。Zp由三种糖蛋白组成，即Zp1，Zp2，Zp3，分子量分别为200kd，120kd及83kd，用电泳可以分离开。研究结果表明，Zp3具有使精子与卵结合的受体作用。受精作用就导致Zp3进行化学修饰，变成Zp3f，Zp3f即不再起精子受体的作用，从而使受精卵不能再度受精。

在高等植物中花粉与雌蕊的柱头之间也存在相互识别的作用。在一朵花的柱头上常有许多不同的花粉落在上面，但是，只有一定的花粉才能萌发，进入花丝并且到达子房进行受精作用。柱头和花丝可以作为筛选不需要的花粉及花粉管的过滤器。

高等植物雌雄性的识别是从花粉与柱头表面的接触开始的。现已证明花粉壁和柱头表面都含有糖蛋白，这些糖蛋白与细胞识别有关。Clarke 等（1979）从唐菖蒲（*Gladiolus*）花粉壁和柱头表面分别提取出糖蛋白，分别占6%和23%。花粉壁

中含有5种糖蛋白，分子量在10,000—75,000之间，柱头含有7种糖蛋白，分子量在10,000—120,000之间。花粉的糖蛋白中含有半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖及鼠李糖。柱头表面的糖蛋白含有阿拉伯半乳聚糖蛋白。已经证明柱头表面的成分具有能与花粉中大分子结合的能力。柱头表面带有识别花粉的受体。如果用ConA与柱头表面结合，就可以降低柱头对花粉蛋白的粘连能力。柱头表面的阿拉伯半乳聚糖可能是粘连的分子基础。花粉与柱头表面所带有的糖蛋白彼此可能是互补的，以提供良好的粘连作用。

花粉壁及柱头表面的相互识别的作用是不同种植物之间不亲和性的根本原因。

杨中汉、曹宗巽等(1981,1984)研究了丝瓜和西葫芦花粉壁的糖蛋白。他们从西葫芦花粉壁中分离出了3种糖蛋白，与PAS试剂反应呈阳性，等电点分别为5.2，6.0，6.3。这些糖蛋白的糖基为鼠李糖、岩藻糖、甘露糖、半乳糖等。张英华和曹宗巽(1983)从萝卜柱头表面浸出液中提取出糖蛋白，用PAS试剂染色，显出明显的糖蛋白区带，分子量为15,000及100,000以上。这些糖蛋白的单糖成分为葡萄糖、鼠李糖、岩藻糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖及甘露糖。这些研究表明，十字花科植物花粉与柱头表面的识别也是靠糖蛋白的互补作用。

四、根瘤菌与豆科植物的共生作用

根瘤菌（Rhizobium）对豆科植物寄主表现出很强的专一性。能感染一种寄主并且形成根瘤的根瘤菌对其它豆科植物通常并不能感染。根瘤菌分类就是根据寄主的专一性。如R.japonicum使大豆产生根瘤，R.trifolii使三叶草产生根瘤，等等。

近年研究证明，豆科植物产生的凝集素（lectins）能识别根瘤菌细胞壁中的糖蛋白，并由此决定寄生与共生物（symbiont）之间是否能建立共生关系。根瘤菌感染豆科植物进行共生固氮，在农作物的氮素营养中是极其重要的。

豆科植物是通过根毛而被根瘤菌侵染的。根瘤菌首先与根毛表面相接触，而后进入根毛形成感染线，到达皮层后刺激寄主细胞分裂而形成根瘤，结瘤与否决定于根瘤菌与寄主之间的相互关系。根瘤菌与寄主的最初接触通常是在根瘤菌的荚膜与寄主根毛细胞壁外层之间发生的，这个过程中包含有哪些细胞表面分子呢？

根瘤菌与寄主的识别机理在大豆及三叶草中研究的较为详细。大豆凝集素（SBL）能与Rhizobium japonicum 专一地结合，荧光素标记的SBL能与R. japonicum 25个品系中的22个品系结合，而9种不能使大豆结瘤的根瘤菌都不能被凝集素结合。由这些观察提出一个假设，大豆与根瘤菌共生关系的专一性是由细菌细胞壁的碳水化合物组分对根表面的识别作用决定的。凝集素的结合部位集中于根瘤菌的一极（pole），根瘤菌一端对准着寄主的根毛表面。

Dazzo 等深入研究了凝集素在三叶草与根瘤菌（R. trifolii）之间的细胞识别中所起的作用。根瘤菌表面及三叶草根细胞含有碳水化合物抗原，能进行交叉反应。三叶草根部的凝集素称为三叶草蛋白A(trifoliin A)，它既能与细菌结合，也能与寄主根部结合，可能是通过共同的抗原受体。

三叶草蛋白是一种糖蛋白，分子量为50,000，与三叶草根瘤菌能专一地结合。这种结合受2-脱氧-D-葡萄糖的抑制。抗凝集素并与荧光素结合的抗血清大部分聚集在三叶草的根毛区，而与其它豆科植物如苜蓿、野豌豆等不结合。无感染力的

R.trifolii突变种或不使三叶草结瘤的根瘤菌对三叶草蛋白A都没有受体。R.trifolii与三叶草凝集素结合的表面成分为一种酸性多糖，其中含有2-脱氧葡萄糖、半乳糖、葡萄糖及葡糖醛酸。

Dazzo等（1981）证明三叶草能分泌糖蛋白trifolin A到根际之中。在根的渗出液中能鉴定出三叶草蛋白A，三叶草蛋白A能与根瘤菌结合。培养液中如果含有氮素，则三叶草根部不分泌三叶草蛋白A到根际中，这个结果证明Solbein于1977年提出的模型是正确的。根据此模型，豆科植物分泌一种蛋白质（凝集素），能与根瘤菌结合，然后此有活性的复合物再与根上的受体结合。在共生作用中寄主与细菌都从能进行交叉反应的糖蛋白的识别作用得到好处。这个糖蛋白既能与根毛细胞壁上的受体结合，也能从根分泌出来与根瘤菌细胞结合。只有共生菌与豆科植物之间能互相识别，才能建立共生关系。

Dazzo等（1979）用免疫化学研究证明，三叶草根瘤菌及三叶草表皮细胞的表面含有一种特殊的抗原，它能进行交叉反应。这表明这两种共生物之间存在结构的相关性。这个抗原带有能与多价的凝集素——三叶草蛋白A结合的受体。三叶草蛋白A的专一的抗原抑制剂为2-脱氧葡萄糖。2-脱氧葡萄糖能专一地抑制三叶草根瘤菌与三叶草根毛附着。后来还证明2-脱氧葡萄糖能专一地促进三叶草蛋白A从三叶草根上洗脱下来，并且抑制R.trifolii荚膜多糖与三叶草根毛的结合。

Dazzo于1981提出了一个根瘤菌附着在三叶草根毛表面的模型。根据此模型，三叶草蛋白A能识别三叶草根瘤菌及三叶草上的相似的糖基，并且以互补方式将它们交联起来形成一种分子结构，促进根瘤菌专一地附着在根毛表面（图13·6）。此模型假设在豆科植物根上有寄主专一的受体部位，在该处发生根瘤

菌的识别作用。他们的实验证明了这些受体，并且定位于根表面。用异硫氰酸荧光素标记R.trifolii荚膜多糖上结合的三叶草蛋白A，将此结合物与无菌的幼苗根部一起保温，然后用荧光显微镜观察，三叶草的受体立即与根瘤菌结合，并且根瘤菌聚集在根毛顶端，这表明表皮细胞分化产生出能识别根瘤菌的受体部位（图13·7，图13·8）。这个实验结果已经用苜蓿、大豆及豌豆根瘤菌重复证实。如果预先用相当的凝集素涂在根瘤菌上，则吸附到寄主根毛上的细菌要比不涂凝集素的细菌多，这表明根表面上存在凝集素的受体。

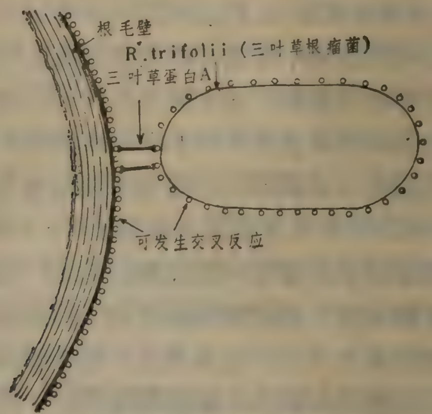


图13·6　根瘤菌与豆科植物根毛相互识别的模型
（Dazzo等，1975）

上述研究结果表明，*R.trifolii*及三叶草根上含有对三叶草蛋白A相似的多糖受体。不过，与三叶草蛋白A相结合的多糖的糖基顺序尚有待研究，才能更好地解释这个问题。

深入了解根瘤菌与豆科植物相互识别的机理，不仅有助于阐明根瘤菌与豆科植物的共生关系，而且有可能为共生固氮菌扩大寄主范围开辟新的途径，将会对农业生产作出贡献。



图13·7 三叶草根瘤菌与三叶草根毛结合的荧光显微照相
荧光素与根瘤菌荚膜结合，然后与根部共同保温，根部荧光显示根瘤菌多糖限于与根毛结合（单箭头→）或与根毛原基（双箭头→→）结合（Dazzo,1977）



图13·8 三叶草根瘤菌与三叶草根毛顶端结合后的扫描电镜照相
(Dazzo,1977)

五、植物的抗病性与糖蛋白

植物感染病毒、细菌或真菌后，往往在寄主体内产生某种蛋白质，其中很多是糖蛋白，同时植物可以产生抗病性，这是植物对外来物的一种反应。

Sela（1962）发现心叶烟（*Nicotiana glutinosa*）感染烟草花叶病毒（TMV）后，即形成局部坏死，而不是全身性的感染，形成坏死病斑，以后即不再感染TMV或其它病毒。这种情况与动物病毒十分相似，动物细胞感染病毒后能产生干扰素(interferon)。抑制病毒的传播。Sela(1981）证明将人的干扰素引入烟草叶片，然后接种TMV，病毒的繁殖受到明显抑制。他在心叶烟中鉴定出一种抗病毒因子（antiviral factor，简称AVF)，它可以使周身性传播变成为局部感染，限制病毒传播，形成坏死病斑。AVF是一种磷酸化的糖蛋白，分子量为22,000，与干扰素十分相似。我们可以用纯化干扰素的方法提纯AVF。Sela用纯化的AVF可以有效地抑制植物病毒的感染，因此有人称之为植物干扰素（phyto-interferon)。

AVF如果加蛋白酶保温，即失去活性，如用α-葡萄糖苷酶及碱性磷酸酯酶保温，也会失去抗病毒的能力。AVF并且能与ConA结合。综合这些性质，可以判断AVF也是一种磷酸化的糖蛋白。

AVF抵抗TMV病毒的能力很强大，AVF的浓度只需要1个pM($=10^{-12}$M)，即可抑制TMV的感染。换言之，每个细胞只需要1个AVF分子即足以抑制病毒的发展。将人的白细胞的干扰素α，注射到烟草叶片中，然后接种TMV(0.001—0.1单位干扰素α／ml)，即可降低TMV50%的感染力。当然AVF是否即为干

扰素，还有待于对AVF一级结构及三维结构的测定。

糖蛋白还有许多其它功能，如糖蛋白与抗冻性有一定关系。北极和南极的鱼类能抵抗低温，在它们的血液中存在一种抗冻糖蛋白（antifreeze glycoprotein），它能降低水的冰点，其血浆冰点的下降是由于有三分之一是这种抗冻糖蛋白。这种糖蛋白含有一种三肽的重复顺序，其氨基酸残基的顺序为苏-丙-丙，重复31次，在每个苏氨酸残基上连接有一种多糖，即半乳糖β(1→3)-N-乙酰半乳糖胺，结构如下：

Galβ(1→3)-GalNAc-Ser(Thr)。

参考文献

1. Boulter, D. & Parthier, B.: Nucleic Acids and Proteins in Plants, vol I., Springer Verlag, 1982.
2. Heslop-Harrison, J.: Cellular Recognition Systems in Plants, Univ. Park Press, 1978
3. Frazier, W. A. et. al.: Cellular Recognition, 1981.
4. Varghese, J. N. et al: Structure of the Influenza Virus Glycoprotein Antigen Neuraminidase at 2.9Å Resolution, Nature 3.03:35—40, 1982.
5. Dazzo, F. B. et al: Presence of Trifolii A, a Rhizobium-binding Lectin, in Clover Root Exudate, J. Supramol. Struct. Cell Biochem. 16:29—41, 1981.
6. 杨中汉、朱广廉、曹宗巽：西葫芦花粉壁蛋白的进一步研究，植物学报，26:45—51，1984。

第十四章　蛋白质的进化

一、引言

目前地球上形形色色的生物，包括动物、植物和微生物，都是长期进化的产物。伟大的生物学家达尔文(Charles Darwin)在一百年前提出了生物进化论，他指出生物的进化是生物的变异(variation)和自然选择(natural selection)的结果，至今达尔文的进化论仍是生物学研究的指导思想，是指导一切生物学的基本理论。

不但各种生物都有其进化的历史，而且构成有机体的生物大分子——蛋白质也有一个进化的历史。1959年Anfinsen写了一本《进化论的分子基础》(The Molecular Basis of Evolutien)，就讨论了这个问题。现在已对2657种蛋白质的一级结构作了测定，并且对200多种蛋白质的三维结构完成了晶体学分析，对其中许多种生物的细胞色素C(cytochrome c)，血红蛋白的α链、β链、核糖核酸酶(ribonuclease)、组蛋白(histone)等的氨基酸顺序都进行了比较研究。这些研究结果充分证明达尔文进化论的正确。下面我们就蛋白质一级结构的进化及三级结构与进化的关系进行一些简单的讨论。

二、蛋白质一级结构的进化

蛋白质一级结构的比较研究，充分证明了进化论的正确。对各种生物中细胞色素C氨基酸顺序的比较以及血红蛋白中α链及β链的比较都可以绘制出进化树(evolutionary tree)。下面分别加以讨论。

1.细胞色素C

细胞色素C是一个古老的蛋白质，从低等生物如酵母、红色链孢霉(Neurospora crassa)就开始出现细胞色素C，它一直进化到高等动物和植物，包括人类在内。

细胞色素C是一种传递电子的载体，分子中含有血红素，分子量为12,400，由104个氨基酸残基组成。血红素Fe上的两个配位键与His 18及Met 80络合。细胞色素C存在于线粒体中。大约在10亿年前，生物进化到需氧的阶段，即出现了生物氧化过程，于是产生了细胞色素C。生物界出现细胞色素C以后，才能在地球上大规模繁衍生存。因此细胞色素C是生物界中广泛存在的一种古老蛋白质。

Margoliash，Smith及Dickerson等人进行了大量工作，测定了各种生物的细胞色素C的氨基酸顺序，从低等生物到高等生物都作了比较研究。他们得到了68种动植物和微生物的细胞色素C的一级结构，在这些生物中细胞色素C的104个氨基酸残基中大约有三分之一是完全相同的(从脊椎动物到昆虫、酵母和小麦)。其它残基上所发生的变化也是相当保守的，一种氨基酸为另一种结构相似的氨基酸所取代。因此在细胞色素C中有70—80个残基完全不变，这表明这部分残基在细胞色素C的分子结构中非常重要。Cys 14，Cys 17，及His 18三个残基是蛋白

质与血红素连接的部分，在各种生物中都不改变。表14·1是选择其中的23种动物、微生物和植物中的细胞色素C的氨基酸顺 序进行了比较。由此可以看出各种生物中氨基酸残基的相似之处。

从上面所测定的68种生物的细胞色素C氨基酸 顺序进行比较，我们可以看出下列的亲缘关系。

①人类与恒河猴同属灵长类(Primate)，它们的氨基酸顺序只差一个残基，即第58位，人类为Ile，而恒河猴为Thr；

②灵长类与其它哺乳类(马、牛、兔等)相差8—12个残基，平均差10.0个残基；

③在哺乳动物之内差别较小，仅差5.1个残基；

④哺乳类与鸟类的顺序差别较大，平均为9.9个残基；

⑤哺乳类与爬虫类之间的差别更大，达到14.3个残基；

⑥陆生脊椎动物与鱼类之间的差别达到18.5个残基；

⑦脊椎动物与无脊椎动物(昆虫等)之间的差别更大，达到26.0个残基；

⑧动物与植物和微生物之间的差别最大，相差47.0个残基，占总残基数的45%。

Dickerson等人根据各种生物的细胞色素C氨基酸顺序的差别和相同之处，绘制出生物界的进化树(evolutionary tree)，也可以称为系统发育树(phylogenic tree)。从蛋白质一级 结构所绘制的进化树与分类学所绘制的进化树是一致的，这说明蛋白质的进化反映了生物的进化(图14·1)。

2。血红蛋白

动物的肌红蛋白与血红蛋白的α、β链的一级结构和三级结构是非常相似的，甚至植物的豆血红蛋白也与它们很相似，这并不是偶然的，因为它们有共同的祖先。它们是由一个祖先的珠蛋白(globin)的基因发生变异形成的。

表14·1　　38种生物中细胞色素c的组成

类群	生物	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
哺乳类动物	人，猩猩									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	I	M	K	C
	恒河猴									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	I	M	K	C
	马									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	驴									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	牛，羊，猪									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	狗									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	兔									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	抹香鲸									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	大灰袋鼠									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
其他脊椎动物	鸡，火鸡									a	G	D	I	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	鸽									a	G	D	I	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	北京鸭									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	龟									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	蛇									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	T	M	K	C
	牛蛙									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C
	金枪鱼									a	G	D	V	A	K	G	K	K	T	F	V	Q	K	C
	小鲨鱼									a	G	D	V	E	K	G	K	K	V	F	V	Q	K	C
昆虫	野生蓖麻蚕					h	G	V	P	A	G	N	A	E	N	G	K	K	I	F	V	Q	R	C
	烟草天蛾					h	G	V	P	A	G	N	A	D	N	G	K	K	I	F	V	Q	R	C
	金蝇					h	G	V	P	A	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	R	C
	果蝇					h	G	V	P	A	G	D	V	E	K	G	K	K	L	F	V	Q	R	C
低等植物	面包酵母				h	T	E	F	K	A	G	S	A	K	K	G	A	T	L	F	K	T	R	C
	假丝酵母			h	P	A	P	F	E	Q	G	S	A	K	K	G	A	T	L	F	K	T	R	C
	链孢霉					h	G	F	S	A	G	D	S	K	K	G	A	N	L	F	K	T	R	C
高等植物	小麦胚	a	A	S	F	S	E	A	P	P	G	N	P	D	A	G	A	K	I	F	K	T	K	C
	荞麦种子	a	A	T	F	S	E	A	P	P	G	N	I	K	S	G	E	K	I	F	K	T	K	C
	向日葵种子	a	A	S	F	A	E	A	P	A	G	D	P	T	T	G	A	K	I	F	K	T	K	C
	绿豆	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	S	K	S	G	E	K	I	F	K	T	K	C
	花椰菜	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	S	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C
	西葫芦	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	S	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C
	芝麻种子	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	V	K	S	G	E	K	I	F	K	T	K	C
	蓖麻子	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	V	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C
	棉花种子	a	A	S	F	Z	E	A	P	P	G	B	A	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C
	苘麻种子	a	A	S	F	Z	E	A	P	P	G	B	A	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C
氨基酸种类的数目											1	3	5	5	5	1	3	3	4	1	4	3	2	1

续表1

		15					20					25					30					35		
哺乳类动物	人，猩猩	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	恒河猴	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	马	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	驴	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	牛，羊，猪	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	狗	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	兔	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	抹香鲸	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	大灰袋鼠	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	N	G	I	F	G
其他脊椎动物	鸡，火鸡	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	鸽	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	北京鸭	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	龟	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	N	G	L	I	G
	蛇	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	牛蛙	A	Q	C	H	T	C	E	K	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	Y	G	L	I	G
	金枪鱼	A	Q	C	H	T	V	E	N	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	W	G	L	F	G
	小鲨鱼	A	Q	C	H	T	V	E	N	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	S	G	L	F	G
昆虫	野生蓖麻蚕	A	Q	C	H	T	V	E	A	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	H	G	F	Y	G
	菸草天蛾	A	Q	C	H	T	V	E	A	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	H	G	F	F	G
	金蝇	A	Q	C	H	T	V	E	A	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	果蝇	A	Q	C	H	T	V	E	A	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	H	G	L	I	G
低等植物	面包酵母	E	L	C	H	T	V	E	K	G	G	P	H	K	V	G	P	N	L	H	G	I	F	G
	假丝酵母	A	E	C	H	T	I	E	A	G	G	P	H	K	V	G	P	N	L	H	G	I	F	S
	链孢霉	A	E	C	H	G	E	G	G	N	L	T	Q	K	I	G	P	A	L	H	G	L	F	G
高等植物	小麦胚	A	Q	C	H	T	V	D	A	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	H	G	L	F	G
	荞麦种子	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
	向日葵种子	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
	绿豆	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
	花椰菜	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
	西葫芦	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
	芝麻种子	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
	蓖麻子	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
	棉花种子	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
	苘麻种子	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G
氨基酸种类的数目		3	3	1	1	2	4	3	4	2	3	4	2	1	4	1	1	2	1	5	1	3	3	2

续表2

				40					45					50					55				
哺乳类动物	人，猩猩	R	K	T	G	Q	A	P	G	Y	S	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W
	恒河猴	R	K	T	G	Q	A	P	G	Y	S	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	马	R	K	T	G	Q	A	P	G	F	T	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	驴	R	K	T	G	Q	A	P	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	牛，羊，猪	R	K	T	G	Q	A	P	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	狗	R	K	T	G	Q	A	P	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	兔	R	K	T	G	Q	A	V	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	抹香鲸	R	K	T	G	Q	A	V	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	大灰袋鼠	R	K	T	G	Q	A	P	G	F	T	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	I	W
其他脊椎动物	鸡，火鸡	R	K	T	G	Q	A	E	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	鸽	R	K	T	G	Q	A	E	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	北京鸭	R	K	T	G	Q	A	E	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	龟	R	K	T	G	Q	A	E	G	F	S	Y	T	E	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	蛇	R	K	T	G	Q	A	V	G	Y	S	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W
	牛蛙	R	K	T	G	Q	A	A	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W
	金枪鱼	R	K	T	G	Q	A	E	G	Y	S	Y	T	D	A	N	K	S	K	G	I	V	W
	小鲨鱼	R	K	T	G	Q	A	Q	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	S	K	G	I	T	W
昆虫	野生蓖麻蚕	R	K	T	G	Q	A	P	G	F	S	Y	S	N	A	N	K	A	K	G	I	T	W
	烟草天蛾	R	K	T	G	Q	A	P	G	F	S	Y	S	N	A	N	K	A	K	G	I	T	W
	金蝇	R	K	T	G	Q	A	A	G	F	A	Y	T	N	A	N	K	A	K	G	I	T	W
	果蝇	R	K	T	G	Q	A	A	G	F	A	Y	T	N	A	N	K	A	K	G	I	T	W
低等植物	面包酵母	R	H	S	G	Q	A	Q	G	Y	S	Y	T	D	A	N	I	K	K	N	V	L	W
	假丝酵母	R	H	S	G	Q	A	Q	G	Y	S	Y	T	D	A	N	K	R	A	G	V	E	W
	链孢霉	R	K	T	G	S	V	D	G	Y	A	Y	T	D	A	N	K	Q	K	G	I	T	W
高等植物	小麦胚	R	Q	S	G	T	T	A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	K	A	V	E	W
	荞麦种子	R	Q	S	G	T	T	A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	K	A	V	T	W
	向日葵种子	R	Q	S	G	T	T	A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	I	W
	绿豆	R	Q	S	G	T	T	A	G	Y	S	Y	S	T	A	N	K	N	M	A	V	I	W
	花椰菜	R	Q	S	G	T	T	A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	K	A	V	E	W
	西葫芦	R	Q	S	G	T	T	P	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	R	A	V	I	W
	芝麻种子	R	Q	S	G	T	T	P	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	I	W
	蓖麻子	R	Q	S	G	T	T	A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	Q	W
	棉花种子	R	Q	S	G	T	T	A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	Q	W
	苘麻种子	R	Q	S	G	T	T	P	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	N	W
氨基酸种类的数目		1	3	2	1	3	3	6	1	2	3	1	2	5	1	1	2	6	4	3	2	7	1

续表3

		60					65					70					75					80		
哺乳类动物	人，猩猩	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	恒河猴	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	马	K	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	驴	K	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	牛，羊，猪	G	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	狗	G	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	兔	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	抹香鲸	G	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	大灰袋鼠	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
其他脊椎动物	鸡，火鸡	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	鸽	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	北京鸭	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	龟	G	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	蛇	G	D	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	牛蛙	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	金枪鱼	N	N	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	小鲨鱼	Q	Q	E	T	L	R	I	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
昆虫	野生蓖麻蚕	G	D	D	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	烟草天蛾	Q	D	D	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	金蝇	Q	D	D	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
	果蝇	Q	D	D	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F
低等植物	面包酵母	D	E	N	N	M	S	E	Y	L	T	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	A	F
	假丝酵母	A	E	P	T	M	S	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	A	F
	链孢霉	D	E	N	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	A	F
高等植物	小麦胚	E	E	N	T	L	Y	D	Y	L	L	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	荞麦种子	G	E	D	T	L	Y	E	Y	L	L	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	向日葵种子	E	E	N	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	绿豆	E	E	K	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	花椰菜	E	E	K	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	西葫芦	E	E	K	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	芝麻种子	G	E	N	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	蓖麻子	G	E	N	T	L	Y	A	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	棉花种子	G	E	N	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
	茼麻种子	G	E	N	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F
氨基酸种类的数目		7	4	5	2	2	5	4	1	1	3	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1

续表4

		83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
哺乳类动物	人，猩猩	V	G	I	K	K	K	E	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
	恒河猴	V	G	I	K	K	K	E	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	A	N	E
	马	A	G	I	K	K	K	T	E	R	E	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
	驴	A	G	I	K	K	K	T	E	R	E	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
	牛，羊，猪	A	G	I	K	K	K	G	E	R	E	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
	狗	A	G	I	K	K	T	G	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	K	E
	兔	A	G	I	K	K	K	D	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
	抹香鲸	A	G	I	K	K	K	G	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
	大灰袋鼠	A	G	I	K	K	K	G	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
其他脊椎动物	鸡，火鸡	A	G	I	K	K	K	S	E	R	V	D	L	I	A	Y	L	K	D	A	T	S	K
	鸽	A	G	I	K	K	K	A	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	Q	A	T	A	K
	北京鸭	A	G	I	K	K	K	S	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	D	A	T	A	K
	龟	A	G	I	K	K	K	A	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	D	A	T	S	K
	蛇	T	G	L	K	K	K	K	E	R	T	N	L	I	A	Y	L	K	F	K	T	A	A
	牛蛙	A	G	I	K	K	K	G	E	R	Q	D	L	I	A	Y	L	K	S	A	C	S	K
	金枪鱼	A	G	I	K	K	K	G	E	R	Q	D	L	V	A	Y	L	K	S	A	T	S	—
	小鲨鱼	A	G	L	K	K	K	S	E	R	Q	D	L	I	A	Y	L	K	K	T	A	A	S
昆虫	野生蓖麻蚕	A	G	L	K	K	A	N	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	S	T	K	—
	烟草天蛾	A	G	L	K	K	A	N	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	Q	A	T	K	—
	金蝇	A	G	L	K	K	P	N	E	R	G	D	L	I	A	Y	L	K	S	A	T	K	—
	果蝇	A	G	L	K	K	P	N	E	R	G	D	L	I	A	Y	L	K	S	A	T	K	—
低等植物	面包酵母	G	G	L	K	K	E	K	D	R	N	D	L	I	T	Y	L	K	K	A	C	E	—
	假丝酵母	G	G	L	K	K	A	K	D	R	N	D	L	V	T	Y	M	L	E	A	S	K	—
	链孢霉	G	G	L	K	K	D	K	D	R	N	D	I	I	T	F	M	K	E	A	T	A	—
高等植物	小麦胚	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	S	S
	荞麦种子	P	G	L	X	K	P	Q	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	D	S	T	E	—
	向日葵种子	P	G	L	X	K	P	Q	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	T	S	T	A	—
	绿豆	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	S	T	A	—
	花椰菜	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	A	T	A	—
	西葫芦	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	F	A	T	A	—
	芝麻种子	P	G	L	X	K	P	Q	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	A	T	A	—
	蓖麻子	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	F	A	T	A	—
	棉花种子	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	S	T	A	—
	苘麻种子	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	S	T	A	—
氨基酸种类的数目		5	1	2	2	1	6	9	2	1	7	2	2	2	2	2	2	2	6	4	4	5	4

疏水，芳香环：F. 苯丙氨酸；W. 色氨酸；Y. 酪氨酸。疏水，非芳香：I. 异亮氨酸；L. 亮氨酸；M. 蛋氨酸；V. 缬氨酸。亲水，碱性：H. 组氨酸；K. 赖氨酸；R. 精氨酸；X. 甲基化赖氨酸。双性的，疏水很弱，极性不荷电：A. 丙氨酸；B. 天门冬酰胺或天门冬氨酸；C. 半胱氨酸；N. 天门冬酰胺；P. 脯氨酸；Q. 谷酰胺；S. 丝氨酸；T. 苏氨酸；Z. 谷酰胺或谷氨酸。无支链，一个氢原子：G. 甘氨酸。链的起点有“a”，表示有一甲基(CH_3)与氨基末端接连；链的起点有“h”，表示没有甲基。

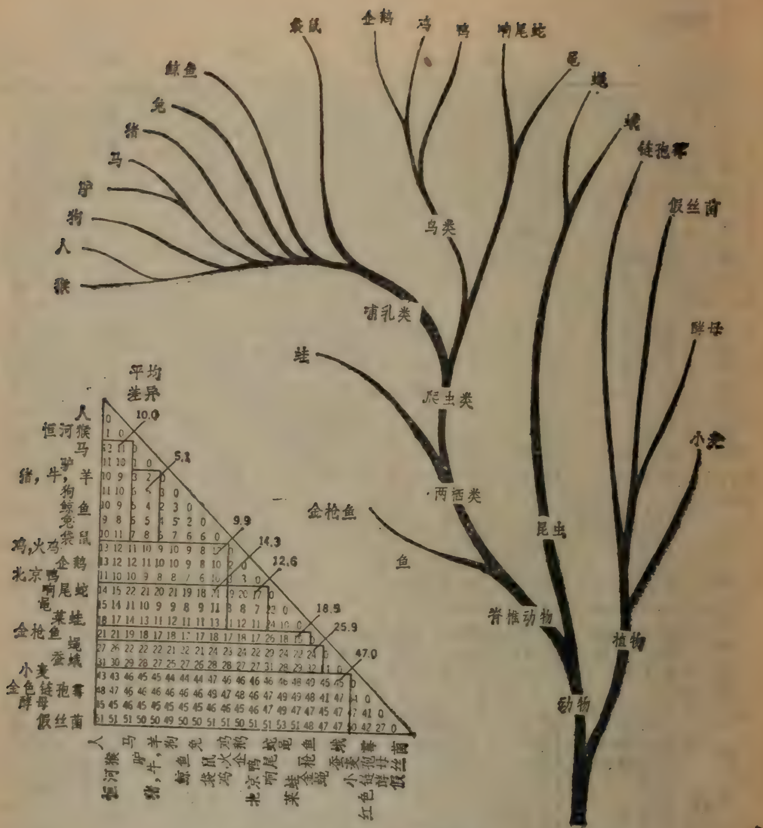


图14·1　细胞色素C的进化树
(Dickerson, 1969)

Goodman, Moore等人研究了脊椎动物的珠蛋白的进化。他们至少比较了从鲨鱼、鲤鱼、毒蛇以至哺乳动物包括人在内60多种生物珠蛋白的α链（含α链、ξ链）的顺序、66个β链（含β、γ、δ、ε）顺序，以及60种肌红蛋白的顺序。此外他们还比较了11种单链的珠蛋白顺序（八目鳗、贝壳类，昆虫的珠蛋白及大豆、羽扇豆根瘤中的豆血红蛋白），得到许多分子进化的资料，现将他们

的研究结果简单介绍如下。

①在60种不同生物的血红蛋白α链中，其141个氨基酸残基中有23个残基完全相同；

②在60种不同生物的β链中，在146个氨基酸残基中有20个



图14·2 生物界中珠蛋白的进化树

(依Dickerson，1982)

残基是完全相同的；

③在60个肌红蛋白中，其153个残基中有27个残基完全相同；

④如果只比较哺乳动物，则氨基酸残基中的相似之处就更多，α链有50个相同，β链有51个相同，肌红蛋白有71个相同。

如果考虑到有些残基具有相同的功能，如Arg与Lys，Leu与Ile功能相同，则α链或β链的一级结构所具有的相同之处就更多了。

经过他们的比较，在所有动物的珠蛋白的α链、β链及肌红蛋白以致于植物的豆血红蛋白中，有两个位置上的氨基酸残基，即CD1肽段上的Phe和F8肽段上的His是完全相同的。如果只比较哺乳类的α链、β链和肌红蛋白的一级结构，则有5个残基位置完全相同。由此可见，在生物界亲缘关系远的物种，一级结构差异较大；而亲缘关系近的物种则差异较小，表明它们有共同的祖先。图14·2为珠蛋白的进化树。

三、蛋白质的三级结构与进化

蛋白质的三级结构与生物的进化也有密切的关系，Rossman等人(1970—1980)研究了各种蛋白质的结构及功能的相似性以后指出，蛋白质的三级结构存在很大的保守性(conservation)。

我们比较不同物种的同一种蛋白质的氨基酸顺序及三维结构，就可以了解(1)在生物的进化过程中，某些氨基酸残基为何保持不变？(2)在决定蛋白质的某种功能上需要结构上哪些最低的要求？

在生物进化过程中，蛋白质的三维结构似乎比蛋白质的氨

基酸顺序更为保守。蛋白质分子最保守的部分通常存在于对功能最重要的折迭之中，例如，各种脱氢酶都具有β折迭桶的基本折迭结构。

具有相似功能的蛋白质通常都是由相似结构的蛋白质所组成。例如：

①在丝氨酸蛋白酶类(serine proteases)中，胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶及弹性蛋白酶的一级结构与三级结构极为相似；

②在各种动物的血红蛋白中，α，β，γ亚基的三维结构都很相似；

③在细胞色素中与血红素基团连接的氨基酸残基及其折迭部分非常保守。各种生物中与血红素的连接部分都是不变的。

Chothia等(1980)比较了9种球蛋白的结构，发现其中相似的二级、三级结构只占分子的16%。但是，其中螺旋最为保守，在各种球蛋白中不变。β-转角的结构也是保守的。例如，弹性蛋白酶分子中有27个β-转角，而在胰凝乳蛋白酶中可以找到其中的21个。

在不同蛋白质中，平行β-折迭片的拓扑几何花样也是相同的。Rossman折迭(βαβαβ)也是一种保守的超二级结构。

由以上资料可以看出，在蛋白质分子中二级结构及超二级结构也属于保守的结构。

参考文献

1. Dickerson, R. E. & I. Geis: Hemoglobin Structure, Function, Evolution and Pathology, Benjamin/Cummings Co., 1983.
2. Dickerson, R. E. and Maya, E: Evolution (A Scientific American Book). W. H. Freeman & Co., 1978.
3. Mathews, F. S.: The Structure Function and Evolution of Cytochromes, Prog. Biophys. Molec. Biol. 45(1985):1—15.

中科院植物所图书馆
S0011910

来源 西单新
书价 2.35
单据号 141351
开票日期 89.4.6.

蛋白质的结构与功能
阎隆飞编著
责任编辑：熊穆葛
*
湖南科学技术出版社出版发行
（长沙市展览馆路8号）
湖南省新华书店经销 湖南省新华印刷二厂印刷
*
1988年11月第1版第1次印刷
开本：787×1092毫米 1/32 印张：8.5 插页1 字数：192,000
印数：1—3,600
ISBN 7—5357—0424—7
Q·8 定价：2.25元
地科88—11

58.17421
798

24831

蛋白质的结构与功能

1988

借者	还期	借者	还期
[illegible]	4/21 1989·4·30		
[illegible]	89.4.30 1989·5·12		
郭[illegible]	89.5.12 1989·6·12		
	…12		

分类	编号
登记号	

58.17421
798

24831

读者注意

1. 爱护公共图书切勿任意卷折和涂写，损坏或遗失照章赔偿。
2. 请在借书期限前送还以便他人阅读请赐予合作。

成1106-1

封面设计：周 颖



58
7

ISBN 7—5357—0424—7
Q·8 定价：2.25元